

MESTRADO

MEDICINA E ONCOLOGIA MOLECULAR

# Diagnóstico genético em cardiomiopatias: uma abordagem multifásica na classificação de variantes genéticas

Márcia Daniela Lemos Baixia

**M**

2018





MESTRADO EM MEDICINA E ONCOLOGIA MOLECULAR

MÁRCIA DANIELA LEMOS BAIXIA

## DIAGNÓSTICO GENÉTICO EM CARDIOMIOPATIAS: UMA ABORDAGEM MULTIFÁSICA NA CLASSIFICAÇÃO DE VARIANTES GENÉTICAS

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina e Oncologia Molecular submetida à Faculdade de Medicina Universidade do Porto.

Orientador – Professor Doutor José Carlos Machado

Afiliação – Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.



*“It is impossible to live without failing at something, unless you live so cautiously that you might as well not have lived at all - in which case, you fail by default.”*

— J.K. Rowling



## Agradecimentos

Aos que me acompanharam neste (longo) processo, eis que vos dirijo umas palavras de agradecimento:

À actual direcção do programa de Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular, na pessoa do Professor Doutor Henrique Almeida, por toda a disponibilidade demonstrada e pela exigência louvável que mantém neste mestrado.

Ao meu orientador, Professor Doutor José Carlos Machado, por ter encontrado um bocado de tempo na sua agenda para me orientar, por toda a ajuda que me deu no decorrer deste trabalho e por ser uma inspiração como diretor do serviço do qual faço parte e como pessoa.

Às minhas colegas de mestrado, que apesar do tempo breve que passamos juntas, foram exemplos de dedicação e de profissionalismo. A todas desejo as maiores felicidades!

Aos meus colegas de trabalho, recentes e antigos, sem exceção, que me acompanham diariamente e que são a pedra basilar da minha dedicação e da minha entrega. Uma palavra especial ao meu coordenador Luis Cirnes, pela companhia e pela disponibilidade; à Sónia Sousa, por me ter arguido e aconselhado na preparação da dissertação; à Cátia Pereira por me ter (literalmente) dado a mão ao longo do processo; à Rafaela Leal e à Joana Reis, que partilham o mesmo caminho (Força meninas! Está quase!) e ao Paulo Canedo, que não me deixou desistir quando eu pensei não ser capaz.

Aos meus amigos, que entre cariocas de limão, me iam confortando e animando nos momentos mais difíceis. Mesmo trabalhando na dissertação aos fins-de-semana, arranjamos sempre tempo para um encontro ocasional.

À minha família, que sabe como ninguém, apoiar e incentivar, e que sabe privar-se de momentos para me dar espaço para poder concretizar objetivos. Foram e são incansáveis!

Ao Jorge Ferreira, que sabe que sem ele eu não seria metade da pessoa que sou hoje. Venham mais 10 anos (e mais 10, e mais 10...).





## Resumo

As cardiomiopatias são um grupo heterogêneo de doenças associadas à disfunção funcional e estrutural do miocárdio. Têm sido descritas diversas mutações em elementos contráteis do sarcómero cardíaco em casos de diferentes tipos de cardiomiopatia. As variantes nos genes estudados em pacientes com cardiomiopatias são conhecidas pela sua expressão clínica variável, penetrância incompleta e diferentes mecanismos de ação. Muitas destas variantes são privadas, em genes modeladores, outras aparecem em conjunto com outras variantes.

Este estudo teve como objetivo principal construir um novo modelo de classificação e interpretação de variantes, para os casos de cardiomiopatias, para uma comunicação mais rápida, correta e informativa de resultados de diagnóstico genético.

Entre janeiro de 2011 e agosto de 2017 foram analisados 1793 casos de cardiomiopatias no Ipatimup Diagnósticos, por NGS, com diferentes painéis. Foram classificadas todas as variantes detetadas, face os critérios da ACMG. Foi realizada uma avaliação dos resultados obtidos ao longo do tempo, interpretação da introdução de novos painéis e do modelo de classificação de variantes no serviço prestado pelo Ipatimup Diagnósticos, nomeadamente no valor preditivo positivo dos testes genéticos para cardiomiopatias. Por fim, realizou-se uma adaptação crítica dos critérios de classificação para cada gene estudado e avaliou-se o impacto desta mudança nas variantes de significado incerto.

Observou-se que, quer a mudança de painéis, quer a introdução da classificação de variantes, teve impacto no serviço prestado e que, após a análise dos critérios da ACMG, é necessário uma adaptação destas a cada gene, para uma classificação mais correta.

Com este trabalho foi possível concluir que a identificação e correta classificação de variantes em doentes com cardiomiopatias deve ser encarada como um projeto a médio/longo prazo. Considera-se crucial avaliar e adaptar as recomendações da ACMG para cada gene e ter informação clínica disponível em cada caso para melhorar a classificação das variantes e consequentemente o tipo de serviço de diagnóstico genético prestado numa instituição como o Ipatimup Diagnósticos.

**Palavras-Chave:** cardiomiopatias, variantes genéticas, classificação, painéis, ACMG.



## Abstract

Cardiomyopathies are a heterogeneous group of diseases associated with myocardium's functional and structural dysfunction. Several mutations in contractile and non-contractile elements of the cardiac sarcomere have been described, in different types of cardiomyopathies. Variants found in cardiomyopathy patients are known for their variable clinical expression, incomplete penetrance and different mechanisms of action. Also, a lot of these variants are private, in modifier genes and are found in co-occurrence with other variants.

The main goal of this study was to build a new variants' interpretation and classification model for cardiomyopathies' cases, to promote a faster, more accurate and more informative communication of genetic tests' results.

Between January of 2011 and August of 2017 1793 cardiomyopathy cases, were analysed in the Diagnostics unit of Ipatimup, with NGS and different gene panels. A classification of every variant found was performed, following ACMG's rules. An evaluation on the service provided by Ipatimup was made taking special attention to the positive predictive value, by looking at the results over time and by performing an interpretation of the introduction of new and larger panels and of the ACMG model for classification of variants.

Finally, a critical adaptation of the ACMG criteria for each gene included in this work was performed and the impact of these changes in variants of uncertain significance was assessed.

The change in panels and the implementation of the ACMG model for classification of variants had an impact on the type of service offered by the genetics's laboratory. After a careful analysis of the framework given by ACMG, the need to adapt it to each gene was evident, for an accurate classification.

With this work it was possible to conclude that the identification and correct classification of variants in cardiomyopathies' patients must be faced as a medium/long term project. We believe that the ACMG criteria must be put to the test and adapt for every gene and that the clinical information is paramount to improve variants' classification and through that improve the overall service of a genetics' service.

**Key words:** cardiomyopathies, genetic variants, classification, panels, ACMG.



## Índice

Agradecimentos .....	I
Resumo .....	III
Abstract .....	V
Índice .....	VII
Índice de Figuras.....	IX
Índice de Tabelas .....	IX
Índice de Gráficos .....	X
Lista de abreviaturas .....	XI
Introdução.....	2
Coração e cardiomiócito .....	2
Anatomia e fisiologia de um coração saudável.....	2
Sarcómero cardíaco .....	2
Cardiomiopatias.....	3
Definição, fenótipos e epidemiologia .....	3
Cardiomiopatia Hipertrófica .....	4
Cardiomiopatia Dialatada.....	4
Cardiomiopatia Não-Compactada do Ventrículo Esquerdo .....	4
<i>Background</i> genético e mecanismos de doença .....	5
Mutações em genes que codificam elementos contráteis .....	5
Mutações em genes que codificam elementos não-contráteis .....	6
Complexidade e desafios na genética das cardiomiopatias.....	7
Classificação de variantes genéticas .....	9
Objetivo Principal.....	12
Objetivos específicos .....	12
Métodos.....	14
Caracterização Molecular.....	14
Amostragem em estudo.....	14
Material Biológico para análise molecular .....	14

Análise Molecular .....	14
Sequenciação paralela massiva (do inglês <i>Massive Parallel Sequencing</i> ou MPS) no Ion PGM™ System e no Ion S5™ XL System.....	14
Classificação das variantes genéticas .....	16
Critérios de classificação de variantes .....	17
Resultados.....	18
Caracterização molecular dos casos de cardiomiopatia.....	18
Resultados ao longo do tempo .....	18
Resultados quanto ao tipo de variante .....	22
Múltiplas variantes – heterozigotia composta, dupla heterozigotia, ou falta de informação? .....	23
Necessidade de construção de um novo algoritmo – avaliação crítica do algoritmo utilizado nas variantes do Ipatimup Diagnósticos.....	23
Discussão .....	34
Discussão dos critérios .....	35
Determinação do impacto dos critérios modificados nas variantes de significado incerto .....	39
Conclusão.....	42
Referências Bibliográficas .....	44
Anexo I .....	48
Anexo II .....	50
Anexo III .....	51
Anexo IV .....	63

## Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática do sarcômero cardíaco. (A) Sarcômero como a unidade básica de contração dos cardiomiócitos. Os filamentos de actina estão ancorados na linha Z e formam interações transientes de deslizamento com os filamentos grossos, compostos por miosina. A tinina conecta a linha Z com a linha M e contribui para as propriedades elásticas e produção de força do sarcômero. (B) Representação das principais proteínas do sarcômero cardíaco. (adaptado de Harvey PA, et al. 2011. (3)) ...	3
Figura 2 - Representação esquemática dos componentes do sarcômero cardíaco. Os componentes sublinhados têm mutações descritas identificadas em doentes com cardiomiopatias primárias. (adaptado de Kimura A, 2016.(12)).....	5
Figura 3 – Categorias clínicas de cardiomiopatias e as suas bases genéticas. Adaptado de Watkins H et al, 2011 (14).....	8
Figura 4 - Critérios para a classificação de variantes segundo as recomendações da ACMG. Adaptado de Richards et al (2015) (24).....	17
Figura 5 – Adequabilidade dos critérios da ACMG nos genes analisados.....	41
Figura 6 - Esquematisação das fases deste trabalho.....	42
Figura 7 - Família estudada no Ipatimup Diagnósticos para a variante A797T no gene MYH7. ....	50
Figura 8 - Esquema representativo da distribuição de variantes patogénicas e benignas ao longo da estrutura de cada proteína. (A) - MYH7 – seta e caixa indicam o cluster de variantes patogénicas neste gene; (B) MYBPC3; (C) LMNA (adaptado de UniProt) .....	63

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Genes estudados no Laboratório de Diagnóstico Genético do Ipatimup Diagnósticos, entre 2012 e 2016 .....	15
Tabela 2 - Casos de cardiomiopatias no Ipatimup Diagnósticos 2011-2017 .....	18
Tabela 3 - Painéis de genes estudados em cardiomiopatias (2011 a 2017).....	20
Tabela 4 - (A) Número de variantes detetadas no Ipatimup Diagnósticos entre 2011 e 2017. (B) Dados acerca das variantes detetadas nos genes MYH7, MYBPC3, TNNT2 e LMNA. ....	22
Tabela 5 - Tabela 2x2 que ilustra o cálculo para o threshold a considerar neste critério..	25
Tabela 6 - Odds Ratio para o cálculo do número de indivíduos afetados a considerar mínimo para a utilização do critério PS4.....	26
Tabela 7 - Cálculo da MAF mínima a ser utilizada nos casos de CMD para os critérios BA1 e BS1.....	37

Tabela 8 - Cálculo da MAF mínima a ser utilizada nos casos de CMH para os critérios BA1 e BS1 .....	37
Tabela 9 - Exemplos da alteração das classificações com a aplicação dos critérios modificados da ACMG em algumas variantes de SI .....	40
Tabela 10 - Lista de primers, sequências e tamanho dos amplicons obtidos .....	48
Tabela 11 - Variantes no gene MYH7 detetadas no Ipatimup Diagnósticos entre 2011 e 2017 (classificação ACMG antes da revisão dos critérios).....	51
Tabela 12 - Variantes no gene MYBPC3 detetadas no Ipatimup Diagnósticos entre 2011 e 2017 (classificação ACMG antes da revisão dos critérios).....	55
Tabela 13 - Variantes no gene TNNT2 detetadas no Ipatimup Diagnósticos entre 2011 e 2017 (classificação ACMG antes da revisão dos critérios).....	59
Tabela 14 - Variantes no gene LMNA detetadas no Ipatimup Diagnósticos entre 2011 e 2017 (classificação ACMG antes da revisão dos critérios).....	61

## Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Status mutacional dos casos índice do Ipatimup Diagnósticos (2011 a meados de 2017 n=1382) .....	19
Gráfico 2 – Separação entre os casos com variantes PP ou P dos casos com variantes SI (2011 a meados de 2017 n=1382) .....	20
Gráfico 3 – Análise do valor preditivo positivo (VPP) ao longo do tempo, nos casos índice (2011 a 2017 n=1382) .....	22
Gráfico 4 - Comparação entre os thresholds de MAF propostos e os valores observados nas variantes do Ipatimup Diagnósticos.....	38



## Lista de abreviaturas

**ACMG** – American College of Molecular Genetics

**ACTC1** – *actin, alpha, cardiac muscle 1*

**AD** – autossômico dominante

**ATP** – adenosina tri-fosfato

**CAV3** – *caveolin 3*

**CMD** – cardiomiopatia dilatada

**CMH** – cardiomiopatia hipertrófica

**CMNCVE** – cardiomiopatia não-compactada do ventrículo esquerdo

**CRYAB** – crystallin alpha B

**CSRP3** – *cysteine and glycine-rich protein 3*

**DMD** – *dystrophin, muscular dystrophy*

**DNA** - *deoxyribonucleic acid* ou ácido desoxirribonucleico, em português

**FATIMA** – FAmilial dilaTed cardIoMyopAthy

**ILK** – *integrin linked kinase*

**Ipatimup** - Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

**LDB3** – *LIM domain binding 3*

**LMNA** – *lamin A/C*

**MAF** – *minimal frequency allele*

**MPS** - *Massive Parallel Sequencing*

**MYBPC3** – *myosin binding protein C, cardiac*

**MYH7** – *myosin heavy chain 7*

**MYL2** – *myosin light chain 2*

**MYL3** – *myosin light chain 3*

**NGS** – *Next Generation Sequencing*

**OBSCN** – *obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF*

**P** – Patogénica

**PCR** - *Polymerase Chain Reaction*

**PP** – Provavelmente Patogénica

**SI** – Significado Incerto

**TCAP** – *titin-cap*

**TNNT2** – *troponin T2, cardiac type*

**TPM1** – *tropomyosin 1*

**TTN** – *titin*

**VPP** – valor preditivo positivo



## Introdução

### Coração e cardiomiócito

#### Anatomia e fisiologia de um coração saudável

O coração é um órgão de peso e tamanho variáveis, constituído por dois átrios e dois ventrículos. Um aumento do tamanho e peso do coração está associado a diversos tipos de doença. Por exemplo, aumento do peso ou da espessura ventricular indica hipertrofia enquanto que o aumento do tamanho das câmaras sugere dilatação (1).

A função de bomba é levada a cabo pelo músculo cardíaco – miocárdio – composto principalmente por células musculares especializadas – miócitos cardíacos ou cardiomiócitos.

#### Sarcómero cardíaco

A unidade contráctil dos cardiomiócitos é o sarcómero, uma rede bem organizada de filamentos grossos compostos principalmente por miosina, filamentos finos que contêm actina e proteínas reguladoras, como a troponina e a tropomiosina (Figura 1) (1).

A contração depende do mecanismo coordenado onde os filamentos de miosina puxam os filamentos de actina para o centro do sarcómero, levando a um encurtamento do miócito e geração de força/tensão (movimento de *cross-bridge*) (2). Quando há uma redução na interação destas proteínas, e consequente redução na força de contração, pode levar a falha cardíaca (1).

A regulação da interação entre a miosina e a actina está dependente da concentração disponível de  $\text{Ca}^{2+}$  e ATP, assim como da ligação do complexo troponina-tropomiosina à actina (2).

A integração funcional dos cardiomiócitos é mediada por estruturas denominadas discos, que ligam as células e que contêm junções intercelulares especializadas, importantes na interação mecânica e eléctrica (iónica) destas células. Uma distribuição espacial anormal destas junções ou das proteínas que as constituem podem contribuir para a disfunção eletromecânica do coração levando a falha cardíaca (1).

O citoesqueleto atua na regulação da morfologia celular, na estabilização das proteínas sarcoméricas e atua como mediador na sinalização biomecânica e bioquímica dos cardiomiócitos, podendo alterar a expressão génica, a modulação pós-translacional e a síntese proteica (2).

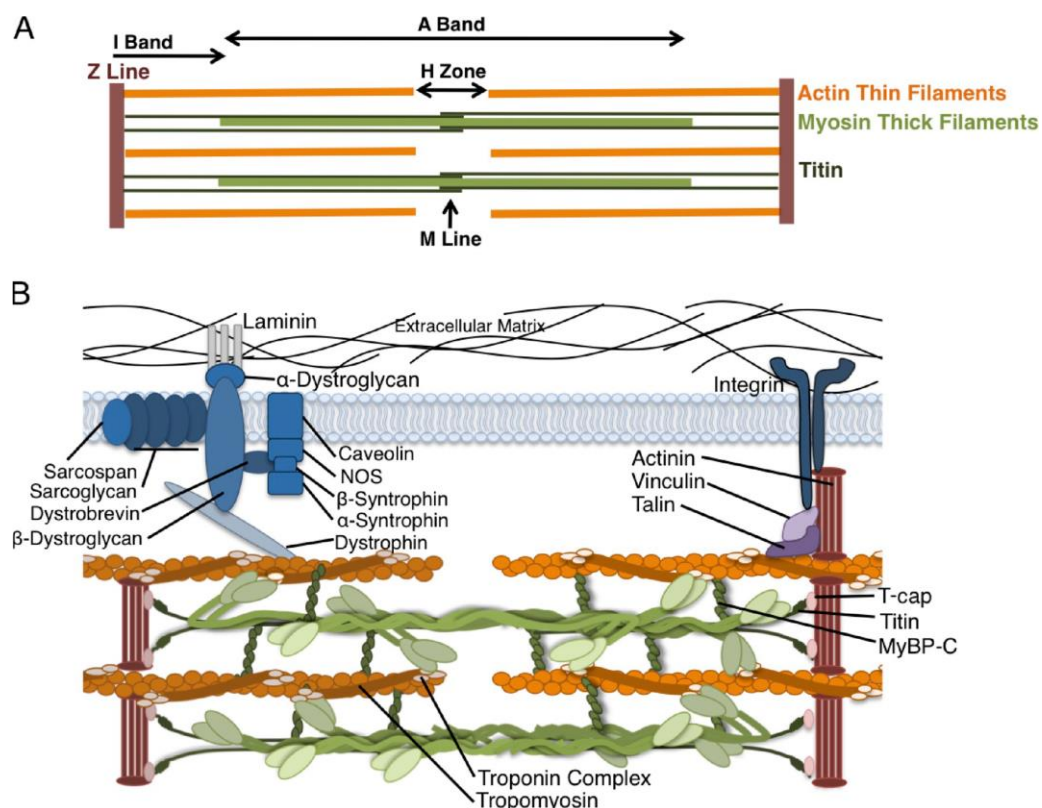


Figura 1 - Representação esquemática do sarcômero cardíaco. (A) Sarcômero como a unidade básica de contração dos cardiomiócitos. Os filamentos de actina estão ancorados na linha Z e formam interações transitentes de deslizamento com os filamentos grossos, compostos por miosina. A titina conecta a linha Z com a linha M e contribui para as propriedades elásticas e produção de força do sarcômero. (B) Representação das principais proteínas do sarcômero cardíaco. (adaptado de Harvey PA, et al. 2011. (3))

## Cardiomiopatias

### Definição, fenótipos e epidemiologia

As cardiomiopatias podem ser definidas como um grupo heterogêneo de doenças associadas à disfunção funcional e estrutural do miocárdio na ausência de doença coronária ou de outras condições suficientes para causar as alterações observadas (3, 4).

Podem ser classificadas como cardiomiopatias primárias ou secundárias (4). Cardiomiopatias secundárias são aquelas causadas por fatores extrínsecos como isquemia, hipertensão e doenças metabólicas. A classificação de cardiomiopatia primária é baseada na exclusão de causas secundárias e deve ser subdividida de acordo com a sua etiologia como sendo genética, mista (genética e não genética), ou adquirida (4).

Existem diferentes tipos clínicos, sendo os mais prevalentes a cardiomiopatia hipertrófica (CMH) e cardiomiopatia dilatada (CMD), que são geralmente definidas como idiopáticas (5-

7). Um outro tipo de cardiomiopatia menos comum é a cardiomiopatia não compactada do ventrículo esquerdo (CMNCVE) (4).

#### Cardiomiopatia Hipertrófica

A CMH é uma doença monogénica, causada por alterações nos genes que codificam componentes proteicos do sarcómero cardíaco (6). Caracteriza-se pela hipertrofia do ventrículo esquerdo, geralmente assimétrica, acompanhada por disfunção miofibrilar e diastólica dos ventrículos (4). Estima-se que a prevalência clínica desta doença seja superior a 1:500 (6, 8). É uma doença com um padrão de transmissão autossómico dominante, contudo tem uma penetrância incompleta e relacionada com a idade e uma expressão fenotípica variável, mesmo em indivíduos da mesma família (9).

#### Cardiomiopatia Dialatada

A CMD caracteriza-se por uma cavidade ventricular dilatada e disfunção sistólica; está associada a falha cardíaca e a morte súbita (4). Os genes associados a esta doença estão envolvidos na geração e transmissão de força, na integridade do sarcómero, na arquitetura nuclear e do citoesqueleto, na homeostasia eletrolítica, na transcrição e na função mitocondrial (10). Estima-se que a prevalência de CMD seja superior a 1:250 (7). O padrão de transmissão da CMD é predominantemente autossómico dominante, contudo pode estar associada a uma transmissão autossómica recessiva, ligada ao X ou até mitocondrial. As manifestações desta doença são pouco específicas e a sua penetrância está dependente da idade, podendo adiar a expressão clínica da doença até à quinta ou sexta década de vida. As variantes genéticas encontradas podem apresentar penetrância incompleta (10).

#### Cardiomiopatia Não-Compactada do Ventrículo Esquerdo

A CMNCVE, também designada por “miocárdio esponjoso”, caracteriza-se pela trabeculação do ventrículo esquerdo assim como pela sua dilatação/hipertrofia (4, 11). A sua prevalência na população não é conhecida, e está descrito que esta doença tem origem no desenvolvimento embrionário, onde se dá uma paragem no processo de compactação do miocárdio após formação da vasculatura coronária (11).

A etiologia das cardiomiopatias primárias não está totalmente esclarecida, contudo, nas últimas décadas têm sido descritas muitas variantes genéticas associadas a estas doenças, sugerindo um papel crítico da genética nestas doenças (5, 12).



mutações em genes potencialmente causadoras da doença, como no gene da  $\alpha$ -tropomiosina (*TPM1*), no gene da troponina-T cardíaca (*TNNT2*), e no gene da proteína-C de ligação à miosina cardíaca (*MYBPC3*) (12).

Uma vez que estes genes codificam elementos contrácteis do sarcómero, analisaram-se outros componentes contrácteis, como o gene cadeia leve essencial da miosina ventricular (*MYL3*), o gene da cadeia leve reguladora da miosina ventricular (*MYL2*), o gene da troponina I cardíaca (*TNNI3*) e o gene da  $\alpha$ -actina cardíaca (*ACTC1*) (12).

Alterações nos elementos contrácteis podem ser encontradas quer em casos de CMH quer em doentes com CMD, contudo existem diferenças nas alterações funcionais, o que leva à determinação dos diferentes fenótipos (12).

Foi formulada a hipótese que as mutações nos elementos contrácteis levassem a uma diminuição na força gerada pelo cardiomiócito, levando a uma compensação hipertrófica para manutenção da função do miocárdio. Contudo, mutações encontradas noutros genes em doentes com CMH sugeriam que a perda de força não fosse o denominador comum das mutações dos elementos contracteis. Assim, chegou-se à conclusão que as mutações associadas à CMH levavam a um aumento da sensibilidade ao cálcio na contração (12).

Aumento na sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  traduz-se num aumento da tensão gerada por uma proteína contráctil mutada quando comparada com uma proteína normal, face à mesma concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (hiper-contração) ou quando as proteínas mutadas estão menos reativas ao relaxamento muscular (disfunção diastólica) (12).

No caso das mutações em elementos contrácteis associadas a CMD há uma diminuição à sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , levando à disfunção sistólica do coração. Esta observação poderá abrir caminho para fármacos que aumentem a sensibilidade para o  $\text{Ca}^{2+}$  nestes doentes, podendo prevenir falha cardíaca (12).

#### Mutações em genes que codificam elementos não-contrácteis

Uma das primeiras alterações em elementos não contrácteis associadas a cardiomiopatias foi no gene que codifica a titina (*TTN*), que se traduzia num aumento da ligação à  $\alpha$ -actina (12).

Mutações encontradas noutros elementos do disco-Z, como no gene da Tcap (*TCAP*) levaram à hipótese que estas alterações resultassem num aumento da ligação entre os componentes deste disco, levando a uma rigidez do sarcómero. O aumento desta rigidez levaria a um aumento da tensão passiva aquando da extensão do sarcómero; esta tensão está associada ao aumento da sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  no músculo cardíaco (12).



As mutações nos genes que codificam elementos do disco-Z, como no *TTN*, *CSRP3*, *TCAP* e *LDB3*, são muito frequentes em doentes com CMD e foram também descritas em doentes com CMNCVE. Mutações no gene *TCAP* e *TTN* apresentaram manifestações funcionais completamente opostas às encontradas em doentes com CMH mutados nos mesmos genes. Na CMD, há uma diminuição na ligação dos componentes do disco, o que leva a uma diminuição da rigidez e ao fenótipo de sarcómero “solto” (12).

Uma série de outras alterações em diversos genes foram descritas como estando associadas às cardiomiopatias primárias, incluindo mutações em genes que codificam elementos da membrana e do citoesqueleto (como são exemplo os genes *DMD*, *LMNA*, *ILK*), genes que codificam proteínas associadas à membrana nuclear (como o gene *LMNA*), e num conjunto de outros genes como *CAV3*, *CRYAB* ou o *OBSCN*, que interagem com os restantes elementos do sarcómero, podendo levar a alterações na resposta ao stress e na mediação/transdução de sinais inter e intracelulares (12).

## Complexidade e desafios na genética das cardiomiopatias

O teste genético no caso das cardiomiopatias é aconselhado por diversas recomendações (13). A descoberta de uma mutação vem dar peso ao diagnóstico clínico, e permite a diferenciação entre geno- ou fenocópias que possam beneficiar de tratamentos específicos. Para além disso, a informação obtida a partir do teste molecular pode ser utilizada para estratégias de aconselhamento genético e para permitir o diagnóstico pré-sintomático de familiares de doentes já diagnosticados, permitindo uma vigilância mais apertada, intervenções cirúrgicas precoces e aconselhamento reprodutivo.

Na prática clínica, o uso de testes moleculares estavam, até há pouco tempo, limitados pela tecnologia utilizada e pelo custo elevado. Contudo, o aparecimento de técnicas de sequenciação paralela massiva trouxe um avanço considerável nesses dois aspetos.

Estes avanços tecnológicos permitem testes moleculares mais complexos, rápidos e económicos, mas trazem consigo novos desafios, nomeadamente na interpretação das variantes genéticas.

As variantes genéticas encontradas em pacientes com cardiomiopatias são conhecidas pela sua expressão clínica variável. Diversos fatores contribuem para as diferentes manifestações fenotípicas (Figura 3) e diferentes graus de severidade da doença em doentes da mesma família com mutações idênticas. Entre estes fatores estão a heterogeneidade genética (diferentes genes causam a mesma doença), a variação alélica



(podem existir diferentes mutações no mesmo gene), assim como o estilo de vida dos doentes e exposição a outros fatores de risco (10).

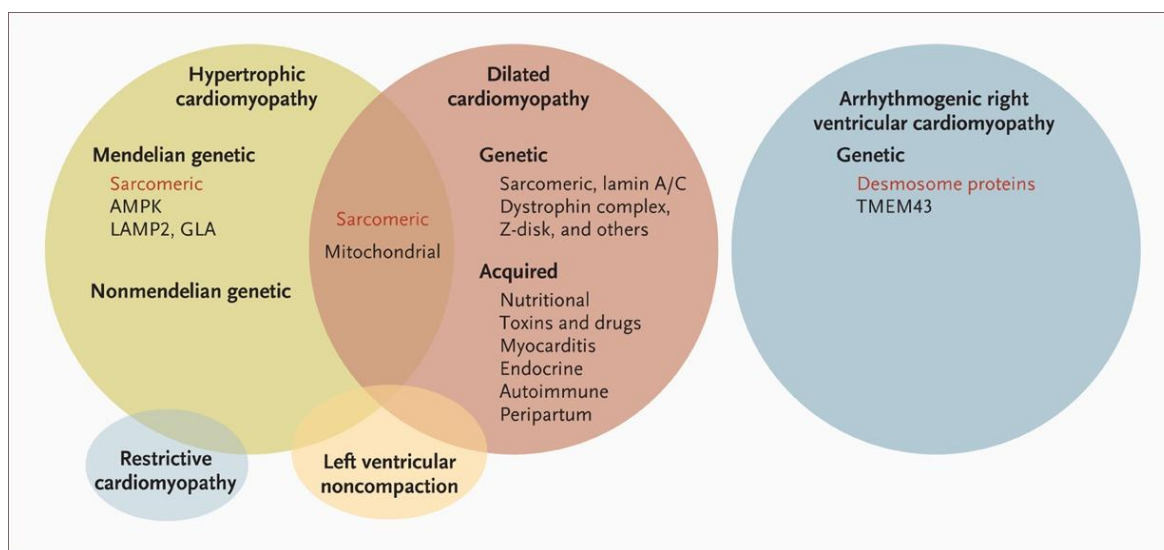


Figura 3 – Categorias clínicas de cardiomiopatias e as suas bases genéticas. Adaptado de Watkins H et al, 2011 (14).

Centenas de variantes, em mais de 80 genes, foram associadas a estas doenças. Contudo, algumas destas associações são baseadas em dados de co-segregação genótipo-fenótipo em famílias ou na ausência de variantes em grupos controlo com número reduzido de participantes. A publicação dos resultados obtidos a partir de novas tecnologias de sequenciação massiva, como é o caso de *Whole Exome Sequencing Project*, teve um contributo significativo para o conhecimento da frequência de variantes em diferentes populações/grupos controlo. Esta informação foi crucial na identificação de variantes previamente reportadas em doentes com cardiomiopatias, mas que na realidade aparecem com uma frequência elevada na população (mais elevada do que a prevalência fenotípica das doenças) sugerindo que se trata de variantes que não atuam como causa monogénica de cardiomiopatias (15).

A complexidade do sarcómero cardíaco, constituído por diversas proteínas, paralelamente com a vasta quantidade de variantes encontradas e o facto de muitas terem surgido *de novo*, são algumas das questões que aumentam a dificuldade na interpretação da importância de cada alteração no contexto etiológico destas doenças (16). Para além disso, a existência de genes modeladores/modificadores e o efeito de múltiplas variantes no mesmo indivíduo podem ser fatores que contribuem para uma heterogeneidade tão marcada (17).

Estão também descritas diferenças entre o tipo de domínio funcional afetado vs fenótipo, para uma mesma proteína. Por exemplo, no gene *ACTC1* foram descritas mutações associadas à CMD no domínio que interage com a  $\alpha$ -actina, enquanto que as mutações associadas à CMH se encontravam no domínio de interação com a cadeia pesada da miosina (18); mais ainda, a proteína actina mutada pode ser incorporada nos filamentos finos, alterando a interação com a miosina nos casos de CMH ou alterando a interação com as proteínas do disco Z nos casos de CMD (12, 19).

Para além disso, é necessário o estudo do contexto biológico de algumas variantes de significado incerto, por exemplo com estudos de segregação ou estudos funcionais (20). De notar que, contudo, a caracterização funcional em modelos pode não ser representativa da fisiologia humana e uma diferença num sistema *in vitro* pode não representar uma alteração com impacto fisiológico e manifestações clínicas (15).

Existem diferentes mecanismos a partir dos quais as variantes encontradas nos genes sarcoméricos podem levar ao desenvolvimento de doença. Algumas mutações dominantes inativam um dos alelos, resultando numa redução da quantidade da proteína funcional incorporada no sarcómero cardíaco (haploinsuficiência), enquanto que outras levam à produção de proteínas mutadas que interferem com a função da proteína normal (dominância negativa). Ainda, algumas variantes podem levar a uma alteração no balanço energético do metabolismo do miocárdio (21). A maior parte das variantes são do tipo *missense*, que se julga estarem associadas a um mecanismo de dominância negativa, levando à origem de péptidos alterados, que são incorporados no sarcómero, e que levam à alteração das funções mecânicas e eletrofisiológicas dos cardiomiócitos (21, 22). As variantes do tipo truncante estão mais associadas a um mecanismo de haploinsuficiência, sendo que os péptidos formados podem também interferir nas funções normais do cardiomiócito, ou serem degradados, por exemplo, pelo sistema ubiquitina-proteossoma (21).

#### Classificação de variantes genéticas

O diagnóstico genético pode auxiliar no aconselhamento genético, identificando indivíduos em risco que necessitem de *follow-up*. Contudo, nas doenças cardíacas ainda existem muitas questões por responder, nomeadamente na translação dos achados genéticos para a aplicação clínica (20). A identificação e correta classificação de variantes genéticas pode levar a uma melhor compreensão da etiologia e progressão da doença, a uma estratificação de risco nos doentes e familiares e a um aconselhamento terapêutico adequado (15, 20).

Com as novas plataformas de sequenciação são requisitados painéis de genes cada vez maiores. Esta estratégia de pesquisa gera um número muito elevado de variantes, onde apenas algumas estão claramente relacionadas com o fenótipo do doente em estudo (23).

Um facto que dificulta o filtro das variantes para análise e classificação é o de que ainda não foi universalmente aceite que, nas cardiomiopatias, uma variante truncante, *nonsense* ou que afete os locais de *splicing* seja provavelmente mais patogénica do que uma alteração do tipo *missense* (10).

A derradeira prova de patogenicidade de uma nova variante reside, ainda, na demonstração de co-segregação da variante com a doença em famílias afetadas. Contudo, esta evidência constitui um problema na maioria dos casos, uma vez que as famílias estudadas envolvem poucos elementos (23).

Contudo, a ausência de dados de co-segregação não deverá ser, por si só, um critério que permita a classificação de uma variante como “Benigna” ou “Provavelmente Benigna”, uma vez que este é um dado que tem limitações (p.e: famílias cada vez mais pequenas, impossibilidade de obter DNA (*deoxyribonucleic acid*) de alguns membros da família). Para além disso, algumas variantes não têm penetrância completa e existem casos de mutações *de novo*, condições que complicam a interpretação dos dados obtidos a partir da análise genética (24).

Existem programas preditivos, que realizam testes *in silico*, que podem ajudar como ferramenta de determinação da patogenicidade de novas variantes, contudo são ainda pouco específicos e não foram desenvolvidos para doenças específicas (23).



## Objetivo Principal

Este estudo teve como objetivo principal construir um novo modelo de classificação e interpretação de variantes, para os casos de cardiomiopatias, para uma comunicação mais rápida, correta e informativa de resultados de diagnóstico genético.

## Objetivos específicos

- Caracterização molecular de casos de cardiomiopatia hipertrófica, dilatada e não-compactada do ventrículo esquerdo e avaliação do impacto da mudança de painéis no serviço de diagnóstico prestado pelo Ipatimup (Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto) Diagnósticos.
- Revisão crítica da aplicação dos critérios da *ACMG* nas variantes detetadas até 2017 no Ipatimup Diagnósticos.
- Reclassificação das variantes encontradas em casos de cardiomiopatias entre 2011 e 2017, com os novos critérios de classificação.
- Cálculo e interpretação do valor preditivo positivo dos testes genéticos para cardiomiopatias, ao longo do tempo.
- Determinação do impacto do novo modelo de classificação no número de variantes de significado incerto (do inglês *Variants of Uncertain Significance* ou VUS).



## Métodos

### Caracterização Molecular

#### Amostragem em estudo

Este estudo baseou-se na classificação das variantes genéticas encontradas numa amostragem de pacientes com diagnóstico clínico, suspeita clínica ou história familiar dos três tipos de cardiomiopatias mais comuns, com pedido para estudo molecular ao serviço de diagnóstico genético do Ipatimup Diagnósticos. O estudo foi composto por uma amostragem de 1793 casos (englobando os anos de 2011 a meados de 2017).

O estudo foi realizado segundo o Artigo 19.º da lei Portuguesa Nº 12/2005 de 26 de Janeiro. Para todas as amostras foi atribuído um número de processo interno de forma a garantir o anonimato dos pacientes. Ao longo de todo o trabalho não foram publicadas informações que possibilitem a identificação dos pacientes envolvidos.

#### Material Biológico para análise molecular

O estudo molecular foi realizado em amostras de DNA genómico, extraído a partir de sangue periférico, com o auxílio do MagNA Pure (Roche) com o kit MagNA Pure LC DNA Isolation Kit – Large Volume (Roche, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. Parte da análise foi realizada a partir de amostras de DNA genómico extraído nas instituições de origem, cujos protocolos de extração não constam neste trabalho.

### Análise Molecular

A preparação de algumas amostras de 2013 a 2015 e de todas as amostras para análise molecular a partir de 2016 foi levada a cabo no âmbito deste projeto de Mestrado. A preparação das amostras dos anos anteriores foi levada a cabo por outras colaboradoras do Ipatimup Diagnósticos.

#### Sequenciação paralela massiva (do inglês *Massive Parallel Sequencing* ou MPS) no Ion PGM™ System e no Ion S5™ XL System

Para os casos entre 2012 e 2016 foi realizada MPS no Ion PGM™ System e para os casos entre 2016 e 2017 a sequenciação foi realizada quer neste sistema quer no Ion S5™ XL System. O fluxo de trabalho foi realizado segundo as condições descritas pelo fabricante, incluindo, de forma sucinta, as seguintes etapas:

**Preparação da biblioteca:** A preparação da biblioteca, nos casos entre 2012 e 2017, iniciou-se com a amplificação dos genes previstos para cada cardiomiopatia (Tabela 1).

*Tabela 1 - Genes estudados no Laboratório de Diagnóstico Genético do Ipatimup Diagnósticos, entre 2012 e 2016*

Cardiomiopatia Hipertrófica

*ACTC1, MYBPC3, MYH7, TNNT2, TPM1, TCAP, CSRP3, MYL2, MYL3, TNNI3*

Cardiomiopatia Dilatada

*ACTC1, MYBPC3, MYH7, TNNT2, TPM1, TCAP, CSRP3, SGCD, PLN, LMNA*

Cardiomiopatia Não Compactada do Ventrículo Esquerdo

*ACTC1, MYBPC3, MYH7, TNNT2, TPM1, TCAP, CSRP3, SGCD, PLN, LMNA, MYL2, MYL3, TNNI3, TAZ, LDB3*

Para a reação de amplificação utilizou-se a *Qiagen® Multiplex PCR Kit* (*Qiagen, Hilden*). A amplificação dos genes em estudo foi efetuada utilizando os *primers* descritos no ANEXO I. Os *primers* foram desenhados com auxílio do programa informático *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). As reações decorreram nos termocicladores *MyCycler™ Thermal Cycler* (*BIO-RAD, Hercules*).

Todas as reações de amplificação incluíram um controlo negativo para controlo de contaminação por DNA exógeno. Após eletroforese horizontal em gel de agarose das reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), para confirmação de amplificação, todos os *amplicons* de um mesmo caso foram juntos num só tubo.

Estes produtos foram purificados utilizando *Agencourt® AMPure® XP Reagent* (*Beckman Coulter IZASA, Carnaxide*) e após quantificação e normalização das suas concentrações para um valor equimolar foram sujeitas a uma digestão enzimática com enzimas de *end-repair*, utilizando o *Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit*, PN 4471252 (*Life Technologies, Carlsbad*).

De seguida, e para ser possível a junção de diferentes amostras num mesmo chip de sequenciação, a estratégia de *DNA Barcoding* foi utilizada (*Xpress™ Barcode Adapters 1–16*, PN 4471250 e *Xpress™ Barcode Adapters 17–32*, PN 4474009 [*Life Technologies, Carlsbad*]). Esta estratégia consiste na ligação de adaptadores específicos (pequenas sequências específicas de oligonucleótidos) aos fragmentos de cada amostra em análise.



Após nova purificação e quantificação utilizando o Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, Carlsbad), efetuou-se a junção das diferentes amostras em proporções equimolares num mesmo *pool*. Seguiu-se a amplificação da biblioteca com a enzima e cálculo da molaridade da mesma para determinação do fator de diluição da biblioteca necessário para a preparação do template.

**Preparação da template:** De acordo com o fator de diluição determinado foi efetuada a diluição da biblioteca, e seguido o protocolo do Ion PGM™ Template OT2 400 Kit, PN MAN0007218, Rev. 2.0 (Life Technologies, Carlsbad). Realização de uma amplificação clonal dos fragmentos de ADN através de PCR de emulsão (emPCR), no Ion OneTouch 2, do qual resultam micro-esferas (Ion Sphere™ Particles – ISPs) revestidas por fragmentos de ADN. Após emPCR efetuou-se o enriquecimento das ISPs positivas<sup>4</sup> no Ion OneTouch™ES utilizando Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 (Life Technologies, Carlsbad).

**AmpliSeq™:** Nos casos entre 2016 e 2017 foram utilizadas mais duas estratégias para a amplificação de genes, aumentando os painéis oferecidos em cada um dos diagnósticos (ANEXO I). Essas estratégias incluíram Ion AmpliSeq™ Exome RDY Kit e Ion AmpliSeq™ Custom DNA Panels desenvolvidos no Ipatimup Diagnósticos (IAD117132).

**MPS no PGM™ ou no Ion S5™ XL System:** A sequenciação das enriched-ISP foi realizada no PGM™ System, utilizando chips do tipo Ion 314™ Chip v2, 316™ Chip v2 ou 318™ Chip v2 e segundo o protocolo Ion PGM™ Sequencing 200 Kit PN MAN0007242, Rev. 2.0 (Life Technologies, Carlsbad) ou no Ion S5™ XL System utilizando chips do tipo Ion 540™ Chip (para bibliotecas preparadas com o Ion AmpliSeq™ Exome RDY Kit) ou do tipo Ion 530™ chip (para bibliotecas preparadas com Ion AmpliSeq™ Custom DNA Panels).

## Classificação das variantes genéticas

Todas as variantes do nosso *cohort* foram classificadas de acordo com as *recomendações* do Colégio Americano de Genética Molecular (do inglês *American College of Molecular Genetics* ou ACMG) (25) (Figura 3), com algumas alterações. Para esta avaliação usamos os dados de MAF a partir do Exome Aggregation Consortium e do Exome Variant Server. Para a análise *in silico* de variantes *missense* utilizaram-se os *softwares* preditivos PolyPhen2, SIFT e MutationTaster. Para análise de variantes sinónimas ou em regiões de *splicing* foi utilizado o *software* Human Splicing Finder. Os dados de co-segregação foram obtidos dos casos familiares do Ipatimup Diagnósticos, de publicações originais e de dados provenientes da base de dados ClinVar.

No Ipatimup Diagnósticos apenas são reportadas, nos relatórios, variantes classificadas como de significado incerto (SI), provavelmente patogénicas (PP) ou patogénicas (P). Assim, neste trabalho, variantes que preencham estes critérios serão referidas como variantes “reportáveis”.

Interpretation of sequence variants | RICHARDS *et al*

## ACMG STANDARDS AND GUIDELINES

	Benign		Pathogenic			
	Strong	Supporting	Supporting	Moderate	Strong	Very strong
Population data	MAF is too high for disorder BA1/BS1 OR observation in controls inconsistent with disease penetrance BS2			Absent in population databases PM2	Prevalence in affecteds statistically increased over controls PS4	
Computational and predictive data		Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene /gene product BP4  Missense in gene where only truncating cause disease BP1  Silent variant with non predicted splice impact BP7  In-frame indels in repeat w/out known function BP3	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene /gene product PP3	Novel missense change at an amino acid residue where a different pathogenic missense change has been seen before PM5  Protein length changing variant PM4	Same amino acid change as an established pathogenic variant PS1	Predicted null variant in a gene where LOF is a known mechanism of disease PVS1
Functional data	Well-established functional studies show no deleterious effect BS3		Missense in gene with low rate of benign missense variants and path. missenses common PP2	Mutational hot spot or well-studied functional domain without benign variation PM1	Well-established functional studies show a deleterious effect PS3	
Segregation data	Nonsegregation with disease BS4		Cosegregation with disease in multiple affected family members PP1	Increased segregation data →		
De novo data				De novo (without paternity & maternity confirmed) PM6	De novo (paternity and maternity confirmed) PS2	
Allelic data		Observed in <i>trans</i> with a dominant variant BP2  Observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant BP2		For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant PM3		
Other database		Reputable source w/out shared data = benign BP6	Reputable source = pathogenic PP5			
Other data		Found in case with an alternate cause BP5	Patient's phenotype or FH highly specific for gene PP4			

**Figure 1 Evidence framework.** This chart organizes each of the criteria by the type of evidence as well as the strength of the criteria for a benign (left side) or pathogenic (right side) assertion. Evidence code descriptions can be found in **Tables 3** and **4**. BS, benign strong; BP, benign supporting; FH, family history; LOF, loss of function; MAF, minor allele frequency; path., pathogenic; PM, pathogenic moderate; PP, pathogenic supporting; PS, pathogenic strong; PVS, pathogenic very strong.

Figura 4 - Critérios para a classificação de variantes segundo as recomendações da ACMG. Adaptado de Richards *et al* (2015) (24).

### Critérios de classificação de variantes

Os critérios de classificação da ACMG servem para determinar se uma variante, num gene que tenha impacto numa doença Mendeliana, poderá ser patogénica para essa mesma doença. Assim, para uma interpretação mais correta e completa, é necessário adaptar cada critério ao contexto de cada doença e de cada gene envolvido nessa doença.

## Resultados

### Caracterização molecular dos casos de cardiomiopatia

Entre janeiro de 2011 e agosto de 2017 foram analisados 1793 casos de cardiomiopatias no Ipatimup Diagnósticos (Tabela 2). Destes casos, mais de 20% foram casos familiares, onde apenas se efetuou a pesquisa da(s) variante(s) encontrada(s) no caso *índice*, para aconselhamento genético e estratificação do risco.

Tabela 2 - Casos de cardiomiopatias no Ipatimup Diagnósticos 2011-2017

TOTAL		
Casos Índice		1382 (77%)
Casos Familiares		411 (33%)
CMH		
Índice		Familiares
929 (67% dos casos índice)		331
CMD		
Índice		Familiares
297 (21% dos casos índice)		54
CMNCVE		55* (4% dos casos índice)
Índice		Familiares
90 (7% dos casos índice)		26
CM Painel Alargado		
Índice		
11 (<1% dos casos índice)		

**\*Nota:** Aquando da implementação dos novos painéis, em 2016, os casos de CMD e CMNCVE passaram a ser contados no mesmo registo. Assim, 55 casos foram registados como MCD+MCNVE painel básico.  
Caso índice - primeiro caso identificado de um grupo de casos relacionados no contexto de uma doença hereditária. Caso familiar – caso onde é (são) estudada(s) a(s) variante(s) encontrada(s) no caso índice.

Em cerca de 37% dos casos *índice* foi detetada alguma variante “reportável” (Gráfico 1), uma vez que todas as variantes classificadas como benignas ou provavelmente benignas, bem como as variantes sinónimas não estabelecidas como patogénicas não são, como já referido, reportadas pelo Ipatimup Diagnósticos. Estes dados vão de acordo com as percentagens descritas na literatura.

### Resultados ao longo do tempo

Fazendo uma análise dos resultados ao longo dos anos incluídos é possível observar que, antes da implementação dos critérios de classificação das variantes da ACMG apenas

eram considerados os casos como positivos (ou “mutados”) ou negativos (ou “*wild-type*”) (Gráfico 1). A partir do momento em que as variantes passaram a ser classificadas (final de 2015, início de 2016) começaram a ser emitidos os primeiros relatórios com resultado *Inconclusivo*, ou seja, onde a(s) variante(s) encontrada(s) era(m) de significado incerto (Gráfico 1).

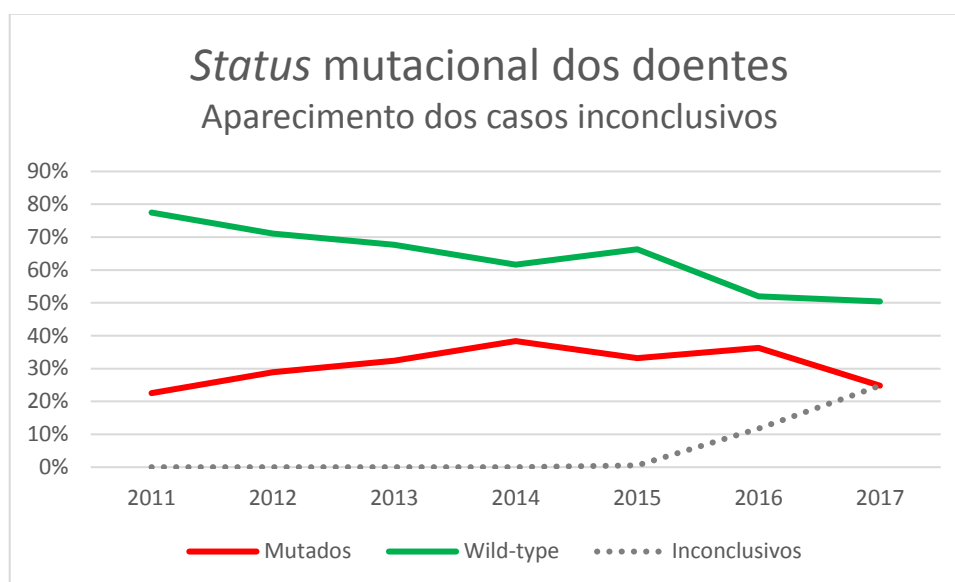


Gráfico 1 – Status mutacional dos casos índex do Ipatimup Diagnósticos (2011 a meados de 2017 n=1382)

Fazendo uma análise mais pormenorizada dos casos que reportados como sendo positivos, a partir da utilização dos critérios de classificação da ACMG, foi possível verificar que nem todos os casos com variantes reportáveis eram, de facto, considerados como portadores de variantes patogénicas.

Assim, ao reclassificar (ou classificar pela primeira vez) todas as variantes encontradas entre 2011 e meados de 2017, observa-se que de todos casos com variante “reportável”, apenas cerca de 50% eram verdadeiros positivos (com variantes P ou PP), sendo os restantes casos considerados inconclusivos, face à classificação atual (Gráfico 2).

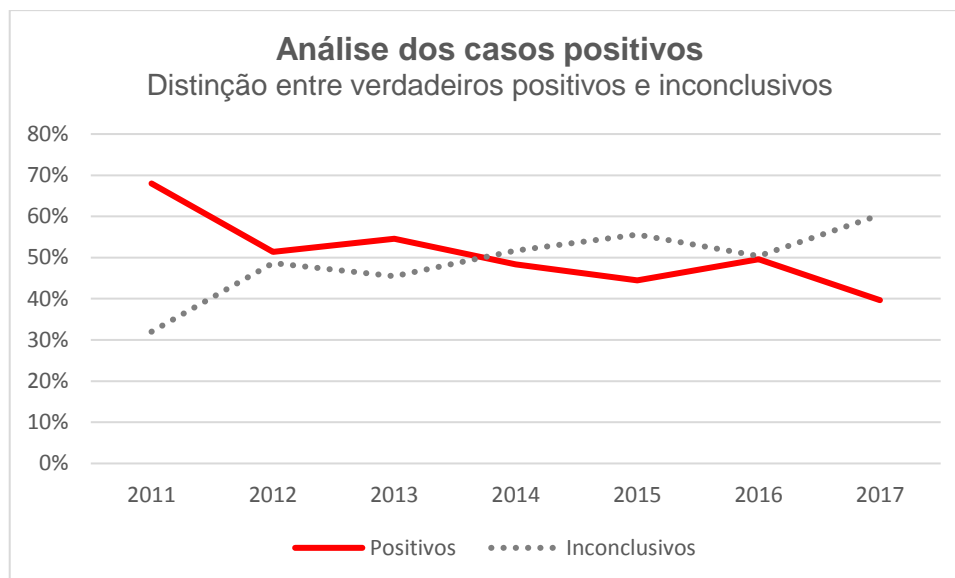


Gráfico 2 – Separação entre os casos com variantes PP ou P dos casos com variantes SI (2011 a meados de 2017 n=1382)

Em 2015 verificou-se o aumento do número de casos inconclusivos face aos casos positivos. Este aumento coincidiu com a integração dos dados de um projeto de investigação (Projeto FATIMA (26)), onde foi analisado um painel mais alargado de genes para os casos de CMD (15 genes ao invés de 10 genes). Para além disso, a partir de meados de 2016, iniciou-se a integração de painéis de análise mais alargados para as cardiomiopatias (Tabela 3).

Tabela 3 - Painéis de genes estudados em cardiomiopatias (2011 a 2017)

2011		
CMH	CMD	CMNCVE
MYH7 (exões 3 a 40), MYBPC3 (exões 1 a 34), ACTC1 (exões 2 a 7), TNNT2 (exões 8 a 16), TNNI3 (exões 7 e 8), TPM1 (exões 2 e 5), MYL2 (exões 2 a 7) e MYL3 (exões 3 e 4).	MYH7 (exões 3 a 40), ACTC1 (exões 5 e 6), TNNT2 (exões 8 a 16) e TPM1 (exões 2 e 5).	MYH7 (exões 3 a 40), MYBPC3 (exões 1 a 34), ACTC1 (exões 2 a 7), TNNT2 (exões 8 a 16), TNNI3 (exões 7 e 8), TPM1 (exões 2 e 5), MYL2 (exões 2 a 7) e MYL3 (exões 3 e 4).
2012-2015		
CMH	CMD	CMNCVE
MYH7, MYBPC3, ACTC1, TNNT2, TNNI3, TPM1, MYL2, MYL3, CSRP3 e TCAP (totalidade da região codificante, incluindo transições intrão-exão).	LMNA, MYH7, MYBPC3, TNNT2, ACTC1, TPM1, CSRP3, TCAP, SGCD e PLN (totalidade da região codificante, incluindo transições intrão-exão).	LDB3, TAZ, LMNA, MYH7, MYBPC3, TNNT2, ACTC1, TPM1, CSRP3, TCAP, SGCD e PLN (totalidade da região codificante, incluindo transições intrão-exão).
2016-2017		
CMH	CMD	CMNCVE
<b>Painel Específico</b> - MYBPC3, MYH7, MYL2, MYL3, TNNI3, TNNT2, TPM1.  <b>Painel Básico</b> - MYBPC3, MYH7, TNNI3, TNNT2, ACTC1, ACTN2, ANKRD1, CASQ2, CAV3, CRYAB, CSRP3, FHL1, FXN, GAA, GLA, JPH2, LAMP2,	<b>Painel Básico</b> - ACTC1, LDB3, LMNA, MYBPC3, MYH7, PLN, TAZ, TNNI3, TNNT2, TPM1, ABCC9, ACTN2, ANKRD1, BAG3, CRYAB, CSRP3, DES, DMD, DTNA, EMD, EYA4, FHL2, FHOD3, FKTN, ILK, LAMA4, LAMP2, MYOZ1,	

MYH6, MYL2, MYL3, OBSCN, PLN, PRKAG2, PTPN11, TCAP, TNNC1, TPM1, TTR, VCL.	MYPN, PSEN1, PSEN2, RBM20, SCN5A, SGCD, TCAP, TMPO, TNNC1, TTN, VCL.
--	--

**Painel Alargado** - ABCC9, ACTC1, ACTN2, ANKRD1, BAG3, CASQ2, CAV3, CHRM2, CRYAB, CSRP3, DES, DMD, DOLK, DSC2, DSG2, DSG3, DSP, DTNA, EMD, EYA4, FHL1, FHL2, FHOD3, FKTN, FXN, GAA, GATAD1, GLA, ILK, JPH2, JUP, LAMA4, LAMP2, LDB3, LMNA, MIB1, MURC, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYLK2, MYOM1, MYOZ1, MYOZ2, MYPN, NEBL, NEXN, OBSCN, PDLIM3, PKP2, PLN, PRDM16, PRKAG2, PSEN1, PSEN2, PTPN11, RAF1, RBM20, RYR2, SCN5A, SGCD, TAZ, TCAP, TGFB3, TMEM43, TMPO, TNNC1, TNNT2, TPM1, TRDN, TTN, TTR, VCL.

Se tivermos em conta a definição de valor preditivo positivo (VPP) como a probabilidade de um indivíduo avaliado e com resultado positivo ser realmente doente (Valor Preditivo Positivo = Verdadeiro Positivo / (Verdadeiro Positivo + Falso Positivo)), para efetuar o cálculo, com a informação disponível, antes do sistema de classificação de variantes, teríamos que assumir:

- Todos os casos índice enviados para teste genético eram de facto doentes com cardiomiopatia (diagnóstico clínico correto);
- Todos os casos índice negativos teriam:
  - Outro diagnóstico clínico;
  - Variantes patogénicas em genes não estudados;
  - Outra causa para a doença (não genética).

Assim, antes do sistema de classificação de variantes, o VPP seria sempre 100% (todos os casos onde foi detetada uma variante são doentes com cardiomiopatia), ou seja, não haveriam falsos positivos.

Com o sistema de classificação de variantes, podemos ajustar a fórmula, de forma a considerar os casos “verdadeiros positivos” (VP) aqueles em que é detetada uma variante PP ou P e os casos “falsos positivos” (FP) aqueles onde é reportada uma (ou mais) variante(s), mas o seu significado é incerto.

Assim, através da análise dos casos índice, é possível observar que um aumento do número de genes analisados, quer de 2011 para 2012 (Tabela 3), quer novamente a partir de 2016, resultou em reduções acentuadas do VPP (Gráfico 3).

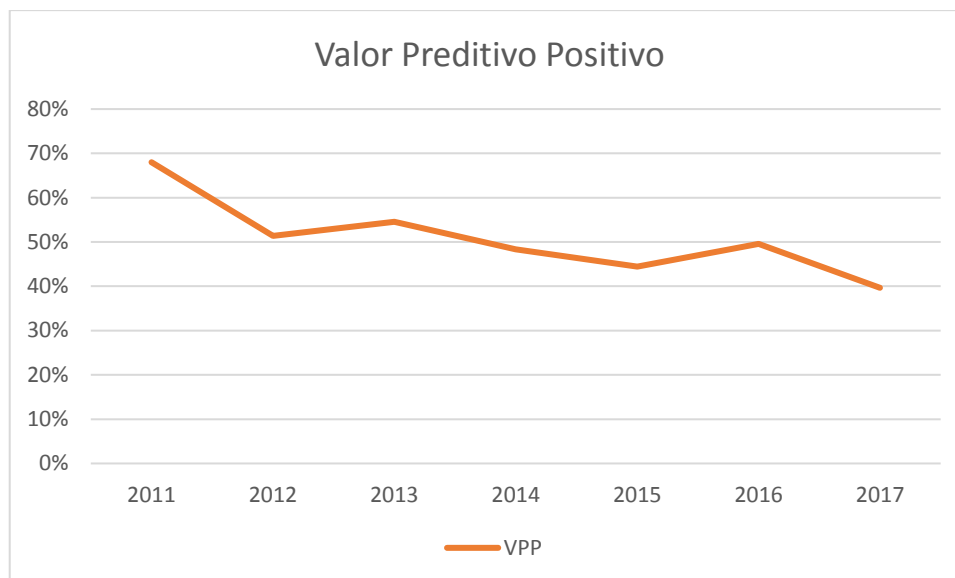


Gráfico 3 – Análise do valor preditivo positivo (VPP) ao longo do tempo, nos casos índice (2011 a 2017 n=1382)

## Resultados quanto ao tipo de variante

Quanto às variantes detetadas pelo laboratório (Tabela 4), nomeadamente nos genes de maior penetrância, *MYH7*, *MYBPC3*, *LMNA* e *TNNT2* foram detetadas mais de 20 variantes diferentes em cada um (Tabela 5). Estes dados incluem todas as variantes encontradas em doentes estudados em contexto dos diferentes tipos de cardiomiopatia (Anexo III).

Destas variantes, apenas cerca de 25% a 30% foram classificadas (25) como patogénicas ou provavelmente patogénicas. Uma grande percentagem de variantes (Tabela 4) foi classificada (25) como de significado incerto.

Tabela 4 - (A) Número de variantes detetadas no Ipatimup Diagnósticos entre 2011 e 2017. (B) Dados acerca das variantes detetadas nos genes *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* e *LMNA*.

(A)				(B)				
					<i>MYH7</i>	<i>MYBPC3</i>	<i>TNNT2</i>	<i>LMNA</i>
<i>MYH7</i>	104	<i>TCAP</i>	4	<b>TOTAL</b>	104	97	29	25
<i>MYBPC3</i>	97	<i>SGCD</i>	4	> 1 variante no mesmo caso	17	26	4	5
<i>TNNT2</i>	29	<i>MYL2</i>	3	Com dados de familiares	23	27	14	9
<i>LMNA</i>	25	<i>ACTC1</i>	2	<b>PP, P</b>	28	27	10	7
<i>LDB3</i>	19	<i>MYL3</i>	2	Missense	27	8	7	4
<i>TPM1</i>	17	<i>PLN</i>	1	Null variants	0	18	1	3
<i>TNNI3</i>	16	<i>TAZ</i>	1	Indels	1	1	2	0
<i>CSRP3</i>	11			<b>SI</b>	45	46	13	11

As variantes de significado incerto foram classificadas, na sua maioria, apenas com os critérios PM2 e PP3, por falta de evidências que permitissem tirar conclusões acerca dos restantes critérios. De notar que 44% das variantes “reportáveis” dos genes *MYH7* e *TNNT2*; 58% do gene *MYBPC3* e 47% do gene *LMNA* foram detetadas/estudadas apenas num caso, levantando a hipótese de algumas delas se tratarem de variantes privadas.

Nos genes *MYH7*, *MYBPC3*, *LMNA* e *TNNT2*, mais de 20% das variantes “reportáveis” foram detetadas em conjunto com uma ou variantes igualmente “reportáveis”, no mesmo gene ou em genes diferentes. De notar que, no Ipatimup Diagnósticos, quando é detetada uma variante classificada como Patogénica ou Provavelmente Patogénica não são reportadas outras variantes que tenham sido detetadas no mesmo caso (mesmo tratando-se de variantes de significado incerto).

#### Múltiplas variantes – heterozigotia composta, dupla heterozigotia, ou falta de informação?

Tendo em conta a literatura (27-32) e os nossos resultados é possível observar que existe uma percentagem considerável (aprox. 20% nos genes *MYH7*, *MYBPC3*, *LMNA* e *TNNT2*) de casos com mais do que uma variante “reportável”.

O efeito destas combinações de variantes é incerto, contudo, se forem combinações de variantes que apareçam em vários doentes, com fenótipos semelhantes, leva a questionar se se trata de um caso de heterozigotia composta (duas variantes no mesmo gene), dupla heterozigotia (duas variantes em genes diferentes) (27) ou de falta de informação de segregação, que nos permita avaliar qual das variantes é, de facto, patogénica.

#### Necessidade de construção de um novo algoritmo – avaliação crítica do algoritmo utilizado nas variantes do Ipatimup Diagnósticos

Aquando da publicação das novas recomendações da *ACMG* para interpretação de variantes, o Ipatimup Diagnósticos dedicou-se a estudá-las, compreendê-las e a implementar este sistema na sua rotina diária. Foi observado que alguns destes critérios não seriam os mais adequados aquando da interpretação no contexto de certas doenças, como as cardiomiopatias. Contudo, só com algum tempo de experiência e com a utilização diária destas recomendações é que foi possível realizar uma avaliação de cada critério, descrita abaixo.



## **Critérios para classificação de variantes patogénicas**

### **Very Strong**

PVS1

---

*Null variant (nonsense, frameshift, canonical  $\pm 1$  or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease*

---

Sabe-se que, no caso das cardiomiopatias, este critério não pode ser aplicado em todos os genes, uma vez que nalguns deles o mecanismo de patogenicidade é ainda desconhecido. No caso do gene *MYH7* são variantes do tipo *missense* que estão descritas com estando associadas à doença, e ainda não existem estudos que comprovem que a perda de função é o mecanismo pelo qual este gene contribui para o desenvolvimento de cardiomiopatias.

Nos casos estudados, das 28 variantes classificadas como PP ou P no gene *MYH7*, 96% eram do tipo *missense*, enquanto que das 29 variantes classificadas como PP ou P no gene *MYBPC3*, mais de 60% eram do tipo *null variant*.

Assim, é necessário avaliar, em cada gene, a pertinência deste critério. Apenas deverá ser utilizado em genes em cujo mecanismo de patogenicidade esteja bem descrito.

### **Strong**

---

*PS2 De novo (both maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history*

---

Este critério deve ter tido em conta em doenças com um padrão de transmissão AD (autossómico dominante), ligado ao X ou com transmissão mitocondrial. A maioria das cardiomiopatias são transmitidas de uma forma AD. No Ipatimup Diagnósticos este critério apenas foi utilizado uma vez, num caso *index*, no gene *LMNA*. Quase nunca foi possível estudar os pais dos doentes e, nos casos familiares, por vezes não é indicado o grau de parentesco, ou não são fornecidos dados sobre a história familiar.

---

*PS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product.*

---

Nos casos estudados para este trabalho, este critério foi usado em apenas 11% e 7% das variantes classificadas como PP e P, nos genes *MYH7* e *MYBPC3*, respetivamente. Nos genes *TNNT2* e *LMNA* foi utilizado em mais de 30% das variantes classificadas como PP ou P. Para além de não existirem estudos funcionais para muitas das variantes encontradas, a maior parte deles cai numa subcategoria PS3\_Suportive, uma vez que não há confirmação que os resultados *in vitro* mimetizem os efeitos que se manifestam *in vivo*, muito menos em mamíferos.

---

*PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared with the prevalence in controls*

---

Este critério foi o mais utilizado nas variantes classificadas como PP e P. Contudo, a sua utilização carece de *thresholds*, uma vez que não consta nas recomendações da ACMG nem na literatura recente, que tenhamos conhecimento, um valor de probandos considerado mínimo para a aplicação deste critério. No Ipatimup Diagnósticos não está definido qual este valor, pelo que a atribuição deste critério pode ser subjetiva a quem faz a interpretação das variantes. Neste critério não entram em linha de conta apenas os casos detetados no Ipatimup Diagnósticos, mas também os descritos na literatura recente e na base de dados ClinVar.

As variantes com impacto funcional detetadas em mais probandos no Ipatimup Diagnósticos foram a **c.2389G>A p.(Ala797Thr)** no gene *MYH7* (17 probandos – ver Anexo II) e as variantes **c.1484G>A p.(Arg495Gln)** e **c.1513\_1515del p.(Lys505del)** no gene *MYBPC3* (22 e 18 probandos, respetivamente).

Em casos em que as variantes são raras, os estudos caso-controlo podem não ter atingido valores estatisticamente significativos, pelo que se deve considerar a identificação da variante em múltiplos probandos com fenótipos consistentes e a sua ausência em controlos.

*Tabela 5 - Tabela 2x2 que ilustra o cálculo para o threshold a considerar neste critério*

	Doentes	Saudáveis
Positivos	a	b
Negativos	c	d
TOTAL	1382 <sup>1</sup>	9261 <sup>2</sup>

1 – Número total de casos *índex* neste estudo. 2 – Número de casos da população Europeia não-filandesa positivos para a variante PP p.(Arg298Cys) do gene *LMNA*, na base de dados populacionais gnomAD (anteriormente designada por ExAC).

Para tentar perceber quais os valores limite a considerar para este critério, precedeu-se ao cálculo do *Odds Ratio* (OR), onde medimos a associação entre genótipo (por exemplo, a variante está presente no genoma) e o fenótipo (por exemplo, o indivíduo é afetado). Um OR de 1.0 assume que ter uma variante não afeta a probabilidade de ter a doença. Valores acima de 1.0 assumem que há uma associação entre ter a variante e o risco de ter a doença.

Para um cálculo mais correto pareceu-nos apropriado utilizar como valor padrão para os casos-controlo o valor mais elevado de MAF para uma variante classificada por nós como PP ou P. Assim, utilizamos o valor de MAF da variante p.(Arg298Cys) do gene *LMNA* (1:18522 na população Europeia), que está presente em 1 de 9261 indivíduos saudáveis (Tabela 5).

Assim, observamos (Tabela 6) que a partir de dois probandos o OR é superior a 5.0 e que o intervalo de confiança não inclui 1.0, tal como aconselhado pelas recomendações da ACMG (25).

*Tabela 6 - Odds Ratio para o cálculo do número de indivíduos afetados a considerar mínimo para a utilização do critério PS4.*

		Nº de saudáveis com variante		
		0	1	IC do IR a 95%
Afetados	1	Infinity	6,7053	from 0.4191 to 107.2681
	2	Infinity	13,4203	from 1.216 to 148.1068
	3	Infinity	20,145	from 2.0939 to 193.8099
	4	Infinity	26,8795	from 3.002 to 240.6738
	5	Infinity	33,6238	from 3.9252 to 288.0267
	6	Infinity	40,3779	from 4.8573 to 335.6544
	7	Infinity	47,1418	from 5.7954 to 383.4672

## Moderate

*PM1 Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation*

No Ipatimup Diagnósticos esta variante nunca foi utilizada uma vez que no caso dos genes putativamente associados às cardiomiopatias, não existem *hot spots* descritos.

*PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) (Table 6) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium*

Este critério apenas é utilizado no Ipatimup Diagnósticos para variantes que não estejam descritas nas bases de dados populacionais. Nas variantes PP e P do gene *MYH7* foi utilizado em 18% dos casos, e no gene *MYBPC3* em 55% dos casos.

Este critério a favor de patogenicidade foi utilizado em mais de 70% das variantes de significado incerto no gene *MYH7* e em mais de 45% no gene *MYBPC3*.

No Ipatimup Diagnósticos, este critério nunca foi utilizado em conjunto com o critério PS4, por se encontrarem na mesma categoria de evidências.

---

*PM3 For recessive disorders, detected in trans with a pathogenic variant*

---

Este critério nunca foi utilizado no Ipatimup Diagnósticos, uma vez que as cardiomiopatias seguem um padrão de transmissão autossômico dominante.

---

*PM4 Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a nonrepeat region or stop-loss variants*

---

Este critério nunca foi utilizado pelo Ipatimup Diagnósticos, nos genes aqui estudados.

---

*PM5 Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before*

---

Este critério apenas foi utilizado em cinco variantes, o total, de todas as variantes detetadas nos genes aqui em estudo.

---

*PM6 Assumed de novo, but without confirmation of paternity and maternity*

---

Este critério nunca foi utilizado pelo Ipatimup Diagnósticos, nos genes aqui estudados.

---

**Supporting**

---

*PP1 Cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease*

---

Este critério foi utilizado em 10 variantes do gene *MYH7*; 6 variantes do gene *MYBPC3*, 5 variantes de gene *TNNT2* e 2 variantes do gene *LMNA*. Os dados obtidos para a atribuição deste critério advêm, na sua grande maioria, de dados da literatura, e não de dados obtidos através do estudo de casos familiares no Ipatimup Diagnósticos. Independentemente do

número de indivíduos/famílias tomados em conta em cada variante, foi sempre atribuído este critério com o mesmo peso (*supporting*).

---

*PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease*

---

No Ipatimup Diagnósticos, este critério apenas foi utilizado nas classificações do gene *MYH7*, onde 27 das 28 variantes PP/P são *missense*. Estes dados vão de encontro com os dados publicado na base de dados ClinVar, onde 357 das 477 variantes PP/P são *missense*. Nos restantes genes aqui estudados, não foi utilizado este critério.

---

*PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)*

---

A regra que se deve aplicar neste critério é “tudo ou nada”, ou seja, apenas se deve considerar este ponto se todos os programas utilizados pelo laboratório forem concordantes ao classificar uma variante como “deleterious” ou “benign”. (33)

No Ipatimup Diagnósticos são comumente utilizados três *softwares* preditivos para as variantes *missense* – *Mutation Taster*, *SIFT* e *PolyPhen-2*. Apenas quando os três foram concordantes se utilizou este critério. No caso das variantes do tipo *null* o único programa utilizado é o *Mutation Taster*, sendo que o seu resultado é reportado no relatório, contudo este critério não é considerado, uma vez que se trata apenas de um programa. No caso das variantes sinónimas utilizam-se os programas *Mutation Taster* e *Human Splicing Finder*.

---

*PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology*

---

Este critério nunca foi utilizado pelo Ipatimup Diagnósticos. Os fenótipos de cardiomiopatia podem ter etiologia genética distinta, existindo poucos estudos que se debrucem na associação genótipo-fenótipo.

---

*PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation*

---

É importante reforçar que este critério apenas deverá ser utilizado quando existe uma classificação da variante por parte de uma fonte segura que não forneceu

evidências/critérios para a classificação atribuída, passíveis de serem revistos pelo laboratório. Este critério foi raramente utilizado pelo Ipatimup Diagnósticos, uma vez que quase sempre que uma variante estava descrita no ClinVar foi possível ter acesso às evidências que levaram os laboratórios a atribuir determinada classificação.

### **Critérios para classificação de variantes benignas**

#### **Stand alone**

---

*BA1 Allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium*

---

Nas recomendações da ACMG é proposto uma MAF superior a 5% para ser considerado um critério suficientemente forte para atribuir, por si só, a classificação de “benigna”.

No Ipatimup Diagnósticos um dos primeiros filtros aplicados no *workflow* de análise é no sentido de eliminar variantes frequentes na população, onde se eliminam da análise variantes com MAF superior a 1%. As restantes variantes, ou são raras ou não têm dados acerca da sua frequência. Este critério já foi atribuído pelo Ipatimup Diagnósticos, contudo foi modificado, à partida, para variantes com uma MAF >1%.

Assim, este critério foi modificado à partida, uma vez que se achava inadequado aos valores limite de MAF considerados pelo laboratório.

#### **Strong**

---

*BS1 Allele frequency is greater than expected for disorder (see Table 6)*

---

Este critério foi utilizado muito poucas vezes pelo Ipatimup Diagnósticos (em apenas 2 a 3 variantes, em cada gene), uma vez que não haviam sido estabelecidos *thresholds* para este critério. Foi utilizado tendo em conta a prevalência esperada da doença na população. Contudo, o termo “superior ao esperado para a doença” envolve mais do que um valor, não apenas a incidência da doença na população.

---

*BS2 Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age*

---

Este critério nunca foi utilizado pelo Ipatimup Diagnósticos, em cardiomiopatias, uma vez que não deve ser considerado em doenças com penetrância reduzida ou onde a idade de manifestação da patologia é variável.

---

*BS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing*

---

Este critério foi utilizado apenas uma vez pelo Ipatimup Diagnósticos, na variante G5R do gene *MYBPC3* (34). Nas variantes consideradas B ou PB, foram atingidos critérios suficientes para a atribuição de uma classificação sem ser necessário a pesquisa de estudos funcionais. Para além disso, como já referido, a literatura é escassa em estudos funcionais, principalmente acerca da função de variantes que são consideradas benignas por outros fatores (MAF; conservação; métodos computacionais preditivos).

---

*BS4 Lack of segregation in affected members of a family*

---

É importante realçar que este critério deve ser interpretado como fenótipo positivo/ genótipo negativo, e não genótipo positivo/fenótipo negativo. No Ipatimup Diagnósticos foi apenas utilizado duas vezes, nos genes aqui estudados.

## **Supportive**

---

*BP1 Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease*

---

No Ipatimup Diagnósticos este critério nunca foi utilizado. Contudo é de observar que, por exemplo, no caso do gene *MYBPC3*, está descrito que as variantes truncantes são as variantes mais associadas à patogenicidade (35). Estes dados são consistentes com as variantes classificadas no Ipatimup (18 das 29 variantes PP/P são truncantes) e na base de dados ClinVar (279 das 603 variantes PP/P são truncantes). Não existem critérios definidos para estabelecer qual a percentagem de variantes a considerar para determinar que se trata de um mecanismo dominante. É um critério que deve ter sido em conta para cada gene.

---

*BP2 Observed in trans with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder or observed in cis with a pathogenic variant in any inheritance pattern*

---

Este critério nunca foi utilizado pelo Ipatimup Diagnósticos, por falta de dados. Caso fosse utilizado apenas poderia ser considerada a possibilidade de se encontrar em *cis* com uma variante patogénica, uma vez que as cardiomiopatias, apesar de autossómicas dominantes, não têm penetrância completa.

---

*BP3 In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function*

---

Este critério nunca foi utilizado pelo Ipatimup Diagnósticos. É um critério que deve ter sido em conta para cada gene.

---

*BP4 Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)*

---

Assim como no critério PP3, a regra que se deve aplicar neste critério é “tudo ou nada”, ou seja, apenas se deve considerar este ponto se todos os programas utilizados pelo laboratório forem concordantes ao classificar uma variante como “deleterious” ou “benign”. (33). No gene *MYH7* foi utilizado em 3 variantes, no gene *MYBPC3* foi utilizado em 8 e no gene *TNNT2* foi utilizado apenas numa variante.

---

*BP5 Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease*

---

Este critério apenas foi utilizado em 3 variantes, no gene *MYBPC3*, onde no mesmo caso foi detetada uma variante classificada por nós como P ou PP.

---

*BP6 Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation*

---

À semelhança do critério PP5, este critério quase nunca foi utilizado pelo Ipatimup Diagnósticos.

---

*BP7 A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved*

---

A política no Ipatimup Diagnósticos é de reportar variantes sinónimas apenas no caso de serem raras e de se encontrarem em regiões de *splicing*. No caso das cardiomiopatias não existem muitos estudos acerca do impacto das variantes sinónimas, contudo existe um



estudo recente que propõe que haja a possibilidade de uma variante sinónima no gene *LMNA* ser provavelmente patogénica (36).



## Discussão

Aquando de uma análise detalhada dos nossos resultados ao longo do tempo, observa-se que a informação fornecida aos médicos e doentes acerca do previsível impacto das variantes encontradas era inicialmente muito reduzida. Os casos eram apenas classificados como “positivos” ou “negativos”, sendo inexistente uma classificação mais informativa para a orientação do acompanhamento dos doentes e familiares.

Quando analisamos, com o conhecimento que possuímos agora, os resultados de anos anteriores, observamos que, em cerca de metade dos resultados positivos, não somos capazes de determinar a patogenicidade das variantes, utilizando os critérios da ACMG.

Existem critérios da ACMG que raramente ou nunca foram utilizados na nossa rotina de classificação para variantes associadas a cardiomiopatias. A não utilização de critérios reflete dois cenários: a adaptação progressiva ao novo sistema de classificação e o não enquadramento de critérios no contexto destas doenças.

Alguns destes critérios apenas podem ser utilizados se tivermos acesso a amostras dos progenitores, por exemplo, para determinar, nos casos em que existe mais do que uma variante em heterozigotia, se as variantes se encontram em *cis* ou em *trans*. Tendo em conta que a maior parte dos casos de cardiomiopatia são autossómicos dominantes, a deteção de uma variante em *trans* com uma variante P seria mais um critério para ser considerada PB.

Na nossa experiência, apenas em cerca de 15 a 20% das variantes foi pedido um estudo familiar. A maioria destes casos veio sem a relação de parentesco, e muitos deles sem qualquer tipo de informação clínica. Este tipo de informação é crucial na aplicação de vários critérios de classificação de variantes, como os critérios de *Cis/Trans* (PM3 e BP2), critérios de segregação (PP1 e BS4) e critérios de variantes *de novo* (PS2 e PM6). Se houver informação na literatura acerca de uma variante ser *de novo*, o Ipatimup Diagnósticos considera que pode ser aplicado o critério PM6.

Por exemplo, numa variante em que se saiba que não consta em bases de dados populacionais (ou que aparece em muita baixa frequência), em que os métodos computacionais preditivos sugerem não ter impacto funcional e onde temos, no nosso laboratório, cerca de 20 pacientes estudados para essa alteração, os dados do genótipo só serão úteis se soubermos a informação clínica e o parentesco dos doentes, para conseguirmos tirar ilações acerca da segregação da variante com a doença. Assim, este tipo de variante aqui descrita, com a informação correta, poderia passar de uma variante

VUS (PS4, BP4) para uma variante PP (adição do critério PP1, que pode ir desde *supporting* a *strong*) ou para uma variante PB (com a adição do critério BS4), fornecendo assim mais informação quer para o clínico quer para os doentes afetados.

Em doenças como as cardiomiopatias, caracterizadas por variantes de penetrância incompleta, o contexto clínico do doente e dos familiares é de extrema importância para avaliar o impacto funcional de cada variante.

Após a perceção do panorama geral de classificação do Ipatimup Diagnósticos, até à data, sugerem-se algumas considerações gerais sobre alguns critérios da ACMG, como modificação, remoção e adição de alguns critérios, no contexto das cardiomiopatias.

#### Discussão dos critérios

##### **Critério PVS1**

Propõe-se que este critério não seja considerado na interpretação de variantes de genes como *MYH7* e que seja mantido em genes como o *MYBPC3*, *LMNA* e *TNNT2*.

##### **Critério PS3**

A literatura propõe que deve ser modificada a força deste critério, tendo em conta os tipos de estudos funcionais e a forma como foram realizados (33). Estudos com condições que mimetizem o mais possível o organismo humano devem ser consideradas mais relevantes. Assim, sugere-se a divisão deste critério em três:

PS3 – Estudos realizados em modelos mamíferos (*in vivo knock-in*, experiências transgénicas ou transfeção transiente), que incluam controlos adequados (controlo *wild-type*, controlo apenas com o vetor, e se possível, controlos com variantes patogénicas e benignas bem estabelecidas).

PS3\_Moderate – Estudos realizados em modelos animais não-mamíferos (*Escherichia coli*, leveduras ou peixe-zebra, por exemplo).

PS3\_Supportive - Estudos realizados *in vitro*.

No caso de um laboratório de diagnóstico genético, este tipo de estudos tornar-se-ia dispendioso e moroso, se fosse necessário para cada variante com critérios insuficientes para ser considerada B, PB, PP ou P, uma vez que muitas variantes apenas foram detetadas em 1 ou 2 casos.

##### **Critério PM1**

Como já referido, este critério nunca foi utilizado pelo Ipatimup Diagnósticos. Contudo, em alguns genes existem zonas consideradas funcionalmente relevantes, uma vez que contêm muitas variantes PP ou P, bem descritas e associadas a doentes com cardiomiopatia.

Comos verificar a dispersão das variantes patogénicas bem estudadas e associadas a cardiomiopatias nos diferentes domínios dos quatro genes avaliados neste estudo, com o auxílio da base de dados UniProt (37) e o único que apresentou um domínio aparentemente mais associado à patogenicidade foi o *MYH7* (ver anexo IV).

Gene	Proteína	Domínio	Cardiomiopatias
<i>MYH7</i> (38)	Cadeia pesada da miosina 7	<i>Head domain</i> (entre os aminoácidos 181–937)	CMH, CMD, CMNCVE

Assim, surge a necessidade de avaliar se existem domínios funcionais mais associados à patogenicidade nas cardiomiopatias, em cada proteína, quer pela pesquisa na literatura, quer pela consulta de bases de dados como a UniProt. No caso de existirem, como é o caso da cadeia pesada da miosina (gene *MYH7*), este critério deve ser utilizado em variantes missense que estejam localizadas no domínio indicado. No caso das restantes proteínas associadas aos genes abordados neste estudo, sugere-se que este critério não seja utilizado.

#### **Critério PP4**

Até agora quase 1500 variantes estão descritas como estando associadas a CMH e a maior parte delas são mutações privadas, e por consequência, dificilmente será possível demonstrar uma correlação genótipo-fenótipo nestes casos. Para além disso, a baixa penetrância e a expressão variável características destas doenças tornam os estudos genótipo-fenótipo pouco reproduzíveis, muitas vezes no que toca à mesma variante (39).

Este critério deverá ser utilizado em variantes do gene *LMNA* que tenham sido detetadas em doentes com défice de condução, ou com fenótipo de cardiomiopatia dilatada, que tenham critérios clínicos bem definidos de uma síndrome que se sobreponha às manifestações cardíacas detetadas (ex: doente com uma laminopatia, como síndrome de Charcot-Marie-Tooth, tipo 2B1). Nos restantes genes estudados no contexto das cardiomiopatias, este critério não deverá ser utilizado.

#### **Critérios BA1 e BS1**

O *threshold* da frequência alélica mínima deve ser ajustado para cada gene, tendo em conta não só a prevalência da doença na população, mas também a prevalência de indivíduos afetados nesse gene no contexto dessa doença e a penetrância (33), que no caso das cardiomiopatias se sabe ser incompleta.

Foi estimada a percentagem de portadores total, utilizando uma penetrância estimada muito baixa para a doença, para estabelecer uma frequência alélica mínima em cada gene, no contexto de cada cardiomiopatia.

*Tabela 7 - Cálculo da MAF mínima a ser utilizada nos casos de CMD para os critérios BA1 e BS1*

Cardiomiopatia dilatada							
<b>Prevalência</b>		1:250 (indivíduos afetados) 1:500 (alelos afetados)					
Gene	Contribuição para a doença	Portadores afetados	Portadores não afetados			Total portadores	Threshold proposto
			Penetrância 10%	Penetrância 50%	Penetrância 100 %	Penetrância 10%	
<i>ACTC1</i>	1%	0,0020%	0,0180%	0,0020%	0,0000%	0,0200%	MAF > 0,1 %
<i>MYBPC3</i>	2% a 4%	0,0080%	0,0720%	0,0080%	0,0000%	0,0800%	MAF > 0,1 %
<i>MYH7</i>	4%	0,0084%	0,0756%	0,0084%	0,0000%	0,0840%	MAF > 0,1 %
<i>TNNT2</i>	3%	0,0058%	0,0522%	0,0058%	0,0000%	0,0580%	MAF > 0,1 %
<i>TPM1</i>	1% a 1,9%	0,0038%	0,0342%	0,0038%	0,0000%	0,0380%	MAF > 0,1 %
<i>TCAP</i>	1%	0,0020%	0,0180%	0,0020%	0,0000%	0,0200%	MAF > 0,1 %
<i>CSRP3</i>	1%	0,0020%	0,0180%	0,0020%	0,0000%	0,0200%	MAF > 0,1 %
<i>SGCD</i>	1%	0,0020%	0,0180%	0,0020%	0,0000%	0,0200%	MAF > 0,1 %
<i>PLN</i>	?	?	?	?	?	?	
<i>LMNA</i>	6%	0,0120%	0,1080%	0,0120%	0,0000%	0,1200%	MAF > 0,5%

*Tabela 8 - Cálculo da MAF mínima a ser utilizada nos casos de CMH para os critérios BA1 e BS1*

Cardiomiopatia hipertrófica							
<b>Prevalência</b>		1:500 (indivíduos afetados) 1:1000 (alelos afetados)					
Gene	Contribuição para a doença	Portadores afetados	Portadores não afetados			Total portadores	Threshold proposto
			Penetrância 10%	Penetrância 50%	Penetrância 100 %	Penetrância 10%	
<i>ACTC1</i>	?	?	?	?	?	?	
<i>MYBPC3</i>	40%	0,040%	0,360%	0,040%	0	0,400%	MAF > 0,5%
<i>MYH7</i>	40%	0,040%	0,360%	0,040%	0	0,400%	MAF > 0,5%
<i>TNNT2</i>	5%	0,005%	0,045%	0,005%	0	0,050%	MAF > 0,1 %
<i>TPM1</i>	2%	0,002%	0,018%	0,002%	0	0,020%	MAF > 0,1 %
<i>TCAP</i>	?	?	?	?	?	?	
<i>CSRP3</i>	?	?	?	?	?	?	
<i>MYL2</i>	?	?	?	?	?	?	
<i>MYL3</i>	1%	0,001%	0,009%	0,009%	0	0,010%	MAF > 0,1 %
<i>TNNI3</i>	5%	0,005%	0,045%	0,045%	0	0,050%	MAF > 0,1 %

Propõe-se assim um **novo threshold** de **0,1%** para o critério **BA1** e um *threshold* de **0,05%** para o critério **BS1**, para os genes aqui estudados.

Tendo em conta os thresholds aqui propostos, é possível verificar que estes se adequam muito mais à realidade dos nossos resultados (Gráfico 4), não correndo o risco de excluir variantes raras com possível impacto funcional.

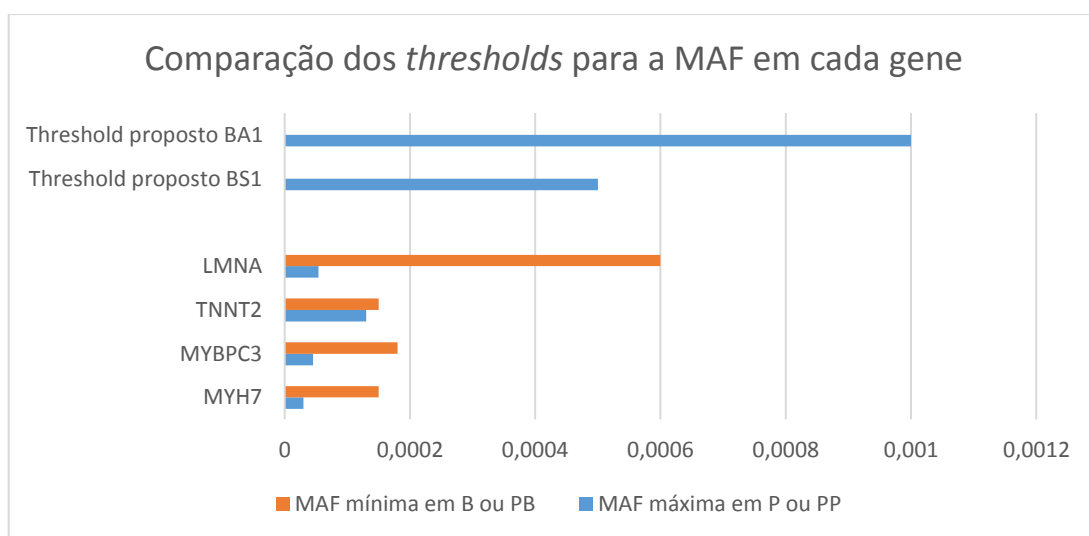


Gráfico 4 - Comparação entre os thresholds de MAF propostos e os valores observados nas variantes do Ipatimup Diagnósticos

## Critérios PM2 e PS4

Estes critérios nunca foram utilizados em conjunto, uma vez que fazem parte do mesmo tipo de evidência, contudo, é possível que uma variante esteja ausente das bases de dados populacionais e que esteja descrita em vários casos com fenótipo de cardiomiopatia (da mesma família, ou não) e ausente nos controlos desses mesmos estudos. Assim, propõe-se que se comece a considerar cada uma destes critérios independentemente, podendo assim, ser utilizados numa mesma variante. Desta forma, variantes que cumpram estes dois critérios poderão ser consideradas provavelmente patogénicas, por si só.

Por exemplo, a variante **c.5134C>T p.(Arg1712Trp)** no gene *MYH7*, classificada pelo Ipatimup Diagnósticos como de SI, cumprindo os critérios PM2, PP3 e PP2, está descrita em pelo menos três publicações originais e tem três entradas independentes no ClinVar. No Ipatimup Diagnósticos foi apenas identificada num doente, contudo, se passarmos a

considerar este critério, pelo menos na sua forma moderada, leva a considerar esta variante como PP.

Pelos cálculos dos OR que efetuamos, chegamos à conclusão que a **partir de dois probandos** já temos confiança suficiente para assumir o critério PS4.

### **Critérios PP2 e BP1**

Propõe-se que o critério PP2 seja considerado na interpretação de variantes *missense* raras do gene *MYH7*, e que o critério BP1 seja considerado na interpretação de variantes *missense* raras do gene *MYBPC3*.

### **Critério BP3**

Nas recomendações da *ACMG* apenas se refere que este critério deve ter sido em conta em «regiões repetitivas, sem função conhecida». Contudo não é claro no documento se este critério se refere aquilo que se designa como regiões repetitivas do genoma (geralmente não-codificantes) ou a regiões codificantes caracterizadas por homopolímeros ou heteropolímeros. Não existe literatura recente, que tenhamos conhecimento, acerca da função de regiões repetitivas nos genes associados às cardiomiopatias. Contudo, deve ser determinado se existem regiões repetitivas do genoma nesses mesmos genes, e se sim, identifica-las. Com o auxílio do software RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>) foi possível verificar que as zonas repetitivas nos genes em estudo se encontram em zonas não codificantes, não analisadas no âmbito das cardiomiopatias. Assim, este critério deve ser levado em conta em homo ou heteropolímeros, em regiões fracamente conservadas na evolução.

### **Determinação do impacto dos critérios modificados nas variantes de significado incerto**

Depois de compreendida a adequabilidade de cada critério, verificou-se se as considerações tiradas ao longo deste trabalho teriam algum impacto na classificação das variantes de SI, que por si só, são menos informativas (Tabela 9).



Tabela 9 - Exemplos da alteração das classificações com a aplicação dos critérios modificados da ACMG em algumas variantes de SI

Gene	cDNA	Proteína	Critério alterado	Alteração da classificação
MYH7	c.599C>T	p.Ala200Val	Introdução do critério PM1; utilização dos critérios PM2 e PS4 em simultâneo (quando aplicável); utilização do critério PP2; remoção dos critérios PP4 e PP5.	SI para PP
MYH7	c.602T>C	p.Ile201Thr		SI para PP
MYH7	c.611G>A	p.Arg204His		SI para PP
MYH7	c.676G>A	p.Ala226Thr		SI para PP
MYH7	c.725C>T	p.Ser242Phe		SI para PP
MYH7	c.872C>T	p.Ser291Phe		SI para PP
MYH7	c.2011C>T	p.Arg671Cys		SI para PP
MYH7	c.2012G>A	p.Arg671His		SI para PP
MYH7	c.2101G>A	p.Gly701Ser		SI para PP
MYH7	c.2134C>T	p.Arg712Cys		SI para PP
MYBPC3	c.1855G>A	p.Glu619Lys	BA1 (MAF > 0,1%)	SI para B
MYBPC3	c.2870C>G	p.Thr957Ser	BA1 (MAF > 0,1%)	SI para B
MYBPC3	c.3392T>C	p.Ile1131Thr	BA1 (MAF > 0,1%)	SI para B
MYBPC3	c.2728C>A	p.Pro910Thr	BS1 (MAF>0,05%)	SI para PB
MYBPC3	c.446C>A	p.Ala149Asp	Introdução do critério BP1	SI para PB
MYBPC3	c.3107G>A	p.Arg1036His	Introdução do critério BP1	SI para PB
LMNA	c.1930C>T	p.Arg644Cys	BA1 (MAF > 0,1%)	SI para B
TNNT2	c.83C>T	p.Ala28Val	BA1 (MAF > 0,1%)	SI para B

Foi possível observar que a alteração de apenas alguns critérios foi suficiente para alterar a classificação de variantes que anteriormente possuíam dados insuficientes para atribuir uma classificação mais informativa.

Um dos genes em que esta alteração é mais notória é o gene *MYH7*, onde mais de 20% das variantes de SI mudariam de classificação, com a compreensão e aplicação dos critérios da ACMG específicos para as características deste gene e das variantes nele encontradas.

No gene *MYBPC3*, apesar do impacto destas alterações ser menor (13% das variantes SI mudariam de classificação), foi possível ficar a compreender melhor qual o papel de cada critério no contexto deste gene, e atribuir uma classificação mais próxima daquilo que se pensava ser o real impacto das variantes apresentadas na Tabela 9.

Evidências de patogenicidade		GENES			
Regra	Criério	MYH7	MYBPC3	TNNT2	LMNA
<b>Very Strong</b>	PVS1	✗	✓	✓	✓
	PS1	✓	✓	✓	✓
	PS2	!	!	!	!
	PS3	!	!	!	!
	PS4	!	!	!	!
<b>Moderate</b>	PM1	✓	✗	✗	✗
	PM2	✓	✓	✓	✓
	PM3	✗	✗	✗	✗
	PM4	✓	✓	✓	✓
	PM5	✓	✓	✓	✓
	PM6	✓	✓	✓	✓
<b>Supporting</b>	PP1	!	!	!	!
	PP2	✓	✗	!	!
	PP3	✓	✓	✓	✓
	PP4	✗	✗	✗	✓
	PP5	✗	✗	✗	✗
Evidências de benignidade		GENES			
Regra	Criério	MYH7	MYBPC3	TNNT2	LMNA
<b>Stand-alone</b>	BA1	!	!	!	!
<b>Strong</b>	BS1	!	!	!	!
	BS2	✗	✗	✗	✗
	BS3	!	!	!	!
	BS4	!	!	!	!
<b>Supporting</b>	BP1	✗	✓	✗	✗
	BP2	!	!	!	!
	BP3	✗	✗	✗	✗
	BP4	✓	✓	✓	✓
	BP5	✓	✓	✓	✓
	BP6	✗	✗	✗	✗
	BP7	!	!	!	!
✓	Aplicável conforme as <i>guidelines</i> originais				
!	Aplicável com alterações (ver discussão)				
✗	Não aplicável				

Figura 5 – Adequabilidade dos critérios da ACMG nos genes analisados.

## Conclusão

Apenas com a experiência é possível um laboratório avaliar criticamente os critérios de classificação em vigor e atestar a sua adequabilidade ao conjunto de doenças que estão em estudo. A escrutinação dos critérios leva também a uma compreensão das lacunas de informação necessária para uma compreensão real da variante, no contexto da doença.

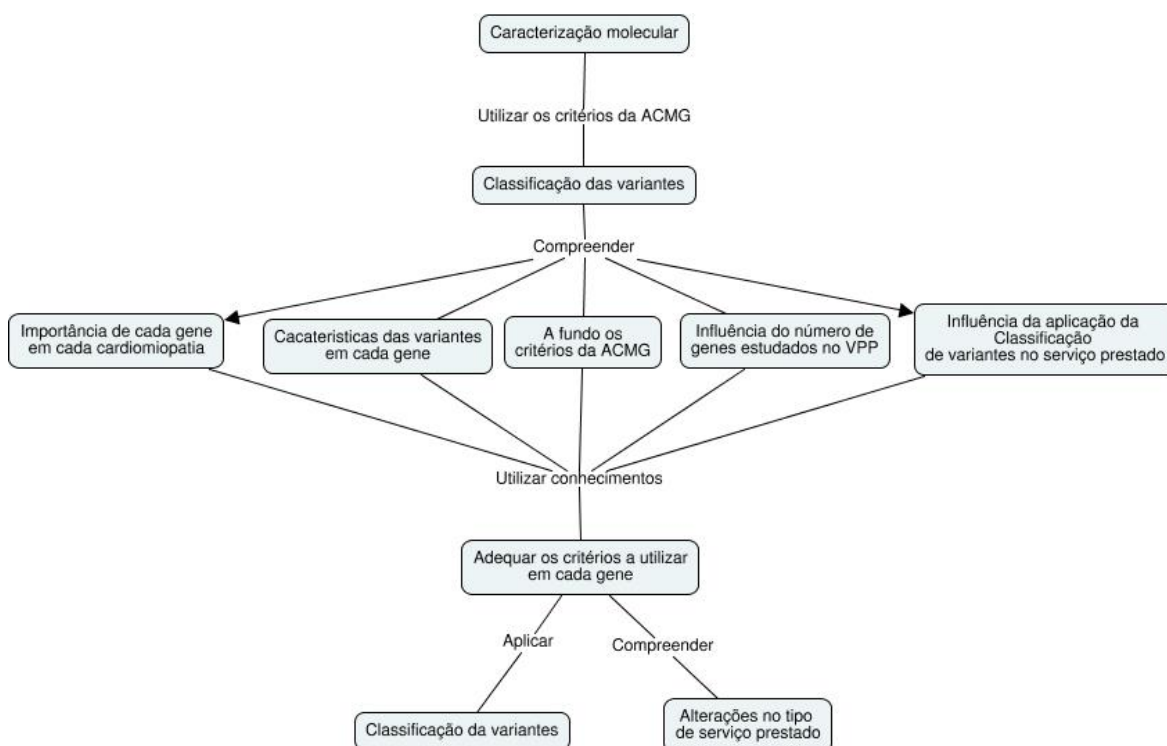


Figura 6 - Esquematização das fases deste trabalho

Ao longo realização deste trabalho foram sendo aplicados diferentes painéis para a compreensão e caracterização genética de doentes com cardiomiopatias. Foram detetadas variantes em casos que teriam sido considerados “negativos” com painéis mais pequenos.

Foi possível observar que, mesmo com um aumento do número de genes, a maioria das variantes se concentra nos genes sarcoméricos, reforçando a sua importância na etiologia genética dos cardiomiopatias. Foi possível observar, também, que um painel com mais genes resulta num aumento do número de variantes, mas não no aumento do VPP do teste em si. É possível detectar mais variantes, no entanto a informação quanto à relevância das mesmas é ainda escassa.

Este fator teve impacto no serviço prestado pelo Ipatimup Diagnósticos no sentido em que é possível fornecer ao clínico mais informação acerca do perfil genético de cada doente,

mesmo que de significado incerto. Neste sentido, essa informação pode ser explorada ao longo do tempo, com estudos de segregação, por exemplo, que podem ser cruciais para a aceção da patogenicidade de uma variante.

A atualização constante, através de revisão bibliográfica, é de extrema importância no acompanhamento da evolução dos painéis oferecidos para diagnóstico genético. É necessário compreender como cada tipo de variante (*null variant*; *missense*; *indel*) pode ter impacto funcional, dependendo do gene em estudo. Para tal, é necessário acompanhar os estudos funcionais recentes, fazer uma avaliação crítica dos mesmos e identificar se os resultados serão extrapoláveis para a realidade do genoma humano; acompanhar estudos de grupos com muitos casos, para ter acesso a dados de segregação e de frequência das variantes, quer em doentes quer em controlos.

Numa realidade como é a do Ipatimup Diagnósticos, em que o número de casos não é tão grande como noutros centros internacionais, é fundamental esta informação para complementar as informações obtidas a partir da casuística.

Com este trabalho considera-se crucial avaliar e adaptar as recomendações da ACMG para cada gene, uma vez que, até para o mesmo conjunto de doenças, como é o caso das cardiomiopatias, diferentes genes apresentam diferentes mecanismos de ação que, apesar de não completamente estudados, se refletem no tipo de variantes encontradas nos doentes.

Conseguimos perceber que a adequação dos critérios utilizados para a classificação de variantes em cada gene pode ter um impacto que vai desde os 7% aos 22% de redução de variantes de SI. Com informação clínica disponível em cada caso (seja índice ou familiar) e estudos de segregação, temos a certeza que estas percentagens podem aumentar ainda mais, podendo melhorar a classificação das variantes e consequentemente o tipo de serviço de diagnóstico genético prestado numa instituição como o Ipatimup Diagnósticos.

Assim, com este trabalho foi possível concluir que a identificação e correta classificação de variantes em doentes com cardiomiopatias deve ser encarada como um projeto a médio/longo prazo. Com uma melhor tragem clínica dos doentes, com a interação próxima entre médicos e laboratório, e um sistema de classificação standardizado e robusto para cada gene, aquilo que é considerado incerto, dentro de alguns anos pode ter informação suficiente para ser classificado como relevante, e pode ter um papel importante no aconselhamento genético das gerações seguintes.

## Referências Bibliográficas

1. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease: Elsevier Health Sciences; 2014.
2. Kuhls DA, Campbell BT, Burke PA, Allee L, Hink A, Letton RW, et al. Survey of American College of Surgeons Committee on Trauma members on firearm injury: Consensus and opportunities. *J Trauma Acute Care Surg*. 2017.
3. Elliott PM. Classification of cardiomyopathies: evolution or revolution? *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(22):2073-4.
4. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies an American heart association scientific statement from the council on clinical cardiology, heart failure and transplantation committee; quality of care and outcomes research and functional genomics and translational biology interdisciplinary working groups; and council on epidemiology and prevention. *Circulation*. 2006;113(14):1807-16.
5. Kimura A. Molecular basis of hereditary cardiomyopathy: abnormalities in calcium sensitivity, stretch response, stress response and beyond. *J Hum Genet*. 2010;55(2):81-90.
6. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy in a General Population of Young Adults. *Echocardiographic Analysis of 4111 Subjects in the CARDIA Study*. 1995;92(4):785-9.
7. Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(9):531-47.
8. Semsarian C, Ingles J, Maron MS, Maron BJ. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(12):1249-54.
9. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy After 20 Years: Clinical Perspectives. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;60(8):705-15.
10. Burke MA, Cook SA, Seidman JG, Seidman CE. Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(25):2871-86.
11. Shemisa K, Li J, Tam M, Barcena J. Left ventricular noncompaction cardiomyopathy. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2013;3(3):170-5.
12. Kimura A. Molecular genetics and pathogenesis of cardiomyopathy. *Journal of human genetics*. 2016;61(1):41-50.
13. Charron P, Arad M, Arbustini E, Basso C, Bilinska Z, Elliott P, et al. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *European heart journal*. 2010;31(22):2715-26.
14. Watkins H, Ashrafian H, Redwood C. Inherited Cardiomyopathies. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(17):1643-56.
15. Andreassen C, Nielsen JB, Refsgaard L, Holst AG, Christensen AH, Andreassen L, et al. New population-based exome data are questioning the pathogenicity of previously cardiomyopathy-associated genetic variants. *European Journal of Human Genetics*. 2013;21(9):918-28.
16. Duncker DJ, Bakkers J, Brundel BJ, Robbins J, Tardiff JC, Carrier L. Animal and in silico models for the study of sarcomeric cardiomyopathies. *Cardiovascular research*. 2015;cvv006.
17. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Correction (Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy). *Circulation*. 2004;109:3258.
18. Olson TM, Doan TP, Kishimoto NY, Whitby FG, Ackerman MJ, Fananapazir L. Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2000;32(9):1687-94.
19. Vang S, Corydon TJ, Børglum AD, Scott MD, Frydman J, Mogensen J, et al. Actin mutations in hypertrophic and dilated cardiomyopathy cause inefficient protein folding and perturbed filament formation. *Febs Journal*. 2005;272(8):2037-49.

20. Ho CY, Charron P, Richard P, Girolami F, Van Spaendonck-Zwarts KY, Pinto Y. Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: state of the art. *Cardiovasc Res*. 2015;105(4):397-408.
21. Tian T, Liu Y, Zhou X, Song L. Progress in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy: a mini-review. *Gerontology*. 2013;59(3):199-205.
22. Seidman J, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*. 2001;104(4):557-67.
23. Dewey FE, Pan S, Wheeler MT, Quake SR, Ashley EA. Dna Sequencing. *Circulation*. 2012;125(7):931-44.
24. Brodehl A, Milting H. Functional studies can contribute to predict the pathogenicity of a novel mutation for cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2017.
25. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*. 2015;17(5):405-23.
26. Martins E, Silva-Cardoso J, Bicho M, Bourbon M, Ceia F, Rebocho MJ, et al. Portuguese study of familial dilated cardiomyopathy: the FATIMA study. *Revista portuguesa de cardiologia : orgao oficial da Sociedade Portuguesa de Cardiologia = Portuguese journal of cardiology : an official journal of the Portuguese Society of Cardiology*. 2008;27(9):1029-42.
27. Kelly M, Semsarian C. Multiple mutations in genetic cardiovascular disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2009;2(2):182-90.
28. Wessels MW, Herkert JC, Frohn-Mulder IM, Dalinghaus M, Van Den Wijngaard A, De Krijger RR, et al. Compound heterozygous or homozygous truncating MYBPC3 mutations cause lethal cardiomyopathy with features of noncompaction and septal defects. *European Journal of Human Genetics*. 2015;23(7):922-8.
29. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, Will ML, Tajik AJ, Gersh BJ, et al. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44(9):1903-10.
30. Ingles J, Doolan A, Chiu C, Seidman J, Seidman C, Semsarian C. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *Journal of Medical Genetics*. 2005;42(10):e59-e.
31. Wang J, Wang Y, Zou Y, Sun K, Wang Z, Ding H, et al. Malignant effects of multiple rare variants in sarcomere genes on the prognosis of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *European journal of heart failure*. 2014;16(9):950-7.
32. Rafael JF, Cruz Filho FEdS, Carvalho ACCd, Gottlieb I, Cazelli JG, Siciliano AP, et al. Myosin-binding Protein C Compound Heterozygous Variant Effect on the Phenotypic Expression of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2017;108(4):354-60.
33. Amendola LM, Jarvik GP, Leo MC, McLaughlin HM, Akkari Y, Amaral MD, et al. Performance of ACMG-AMP variant-interpretation guidelines among nine laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium. *The American Journal of Human Genetics*. 2016;98(6):1067-76.
34. Ratti J, Rostkova E, Gautel M, Pfuhl M. Structure and Interactions of Myosin-binding Protein C Domain C0: CARDIAC-SPECIFIC REGULATION OF MYOSIN AT ITS NECK? *The Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(14):12650-8.
35. Marston S, Copeland ON, Gehmlich K, Schlossarek S, Carrrier L. How do MYBPC3 mutations cause hypertrophic cardiomyopathy? *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. 2012;33(1):75-80.
36. Ito K, Patel PN, Gorham JM, McDonough B, DePalma SR, Adler EE, et al. Identification of pathogenic gene mutations in LMNA and MYBPC3 that alter RNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017;114(29):7689-94.
37. Wu CH, Apweiler R, Bairoch A, Natale DA, Barker WC, Boeckmann B, et al. The Universal Protein Resource (UniProt): an expanding universe of protein information. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(Database issue):D187-D91.

38. Walsh R, Rutland C, Thomas R, Loughna S. Cardiomyopathy: a systematic review of disease-causing mutations in myosin heavy chain 7 and their phenotypic manifestations. *Cardiology*. 2010;115(1):49-60.
39. Restrepo-Cordoba MA, Campuzano O, Ripoll-Vera T, Cobo-Marcos M, Mademont-Soler I, Gámez JM, et al. Usefulness of Genetic Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy: an Analysis Using Real-World Data. *Journal of Cardiovascular Translational Research*.1-12.





# Anexo I

Tabela 10 - Lista de primers, sequências e tamanho dos amplicons obtidos

Gene	Exão	Primer F	Primer R	Tamanho (bp)
MYH7	3	TCTTGACTCTTGAGCATGGTGCTA	TCTGTCCACCCAGGTGTACAGGTG	381
	4	AGGAAGGAGGGAAAGCCAGGCTG	TCTGCATGCACATCAATCTGAGTAA	380
	5	ATCTTTCTCTAACTCCCAAAATCA	ACTCACGTGATCAGGATGGACTGG	398
	6	GAAGGAAGGGAGAGCCCCACG	GAGGCTGAGTCTATGCCTCGGGG	198
	7	CTTGCTGGTCTCCAGTAGTATTGT	CTGCGGTACAGGACCTTGGAGGGC	198
	8	GCCCTCCAAGGTCCTGTACCGCAG	GTCCAAGTCCCAAGGCCAAGGTCA	200
	9	GACAACCTCTCCCGCTTCGTG	AACAGAGGGAGGGAGGGGAGAG	281
	10	CCTTTTGCTTGCTACATTATCAT	GCCACAAGCAGAGGGGACCAG	252
	11	CTGCTTCCTCAGGCCATGTGCTGT	ACCAATGGCCAGAGTCTTAGCTCT	284
	12	CACAGGGATTAAGGAGACAAGTTT	TTACAGCTGCCCAAGAATC	273
	13	AGTCATCTCTTTACCACTTTGCTA	ATTATCATCTGAAGATGGACCCACC	186
	14	CAAGTTCACTCTTCCCAACAACCT	ATGTGGGAGCGAGTGAGTGATTGTT	258
	15	ACTCACCCCACTTTCTGACTGCTC	GAATTCAGGTGGTAAGGCCAAAGAG	247
	16	ATAACTGTACTCAGAGCTGAGCCTA	TCCATCCCACTGAGTCTGTAAACCT	578
	17	GCAAATGCCAGCAAGGATGTAAAG	AGAGAAGGGAGATGGGAAGTAA	359
	18	CATCTCTGTGACTTCTCGAATTCT	CACGTGTGGTGGTAGGTAGGGAGAT	300
	19	ACAAAGCCAGGATCAGAACCAGAG	GTCCAGAGTCACCCATGCTCTGCA	323
	20	TGGGTATGAGGGTGCACAGAGCT	GCATCAGAGGAGTCAATGGAAAAG	330
	21	TAGGCTGTTACCTTCTCTAAGGTA	GCCTCTGACCTGTGACTGTCAGTG	374
	22	GGACCTCAGGTAGGAAGGAGGCAG	TGTGCAGGGAGGTGCAGGGTTGTG	390
	23	TCCTATTGAGTGATGTGCCTCTC	ATGGTCTGAGAGTCTGATGAGAC	390
	24	AGATGGCACCAAGCTGGTGACCTT	TCTGGGCACAGATAGACATGGCAT	290
	25	GGCAATCTCAGAGTCCCTAATAA	TTTTTGCAGGGAGGACCATCTAA	508
	26	ACTTTTACCTGTATCATTACCAT	GCCTCCATGGACACATAATCAGTT	306
	27A	AGCCGAGAGCCTTTTAGAGC	TCTCCTTCTCCAGCTTCTGC	404
	27B	GAGGCCGAGTTCAGAAAGAT	GGAGGAGGAAGTTGGAGGAG	266
	28	CCTCCCTTTCTGTCCATGTAGTG	CTCACCTGGGGAAGCACCAATTCTA	511
	29	CTAGAGGAGGAGGTGGGGATAGAG	GAAGTGATTTGATGCAAGGCTAGT	245
	30	GTGGGGTGTGCTTTATGGAGA	GGCCTCAGCCAGAAGTCA	289
	31	GCCCTGCTGGGATCCTCT	TCCAGGGTCTGTCTCAGGAC	492
	32	GGTTCACTGAGAGGGCCAGAC	GTCCAGTGGAGTTGGAGGGACACG	418
	33	CCAAGGGCTCCAAGAGGCGTCTG	GGATGGGACAGTGAACAAAACGAC	323
	34A	TTTCTCCACCTTCTGCTTC	GGCTCTTGACTTGTCTCTGG	429
	34B	AAGATGGAAGGAGACCTCAATG	ACGATGGCGATGTTCTCC	344
	35	TGCCTTTAGTGAAGGGAACC	CTCAAGCCTTGCTTGCTGAG	404
	36	GAGTTGCGTGCCGTGGTG	GGCGATCTGCTCGGCTTCGTC	586
	37	CCACTCCACGACCCGATCCA	TGGGGCAGGGCTAGGCAAGTTTA	524
	38	TCTTTGGACTCTTCTGGTACA	CTCCTGCGGGAGGTGGGAGCAT	412
	39	TGCAGCTAAAGGTCAAGGCCATACA	ACATGGTAGACATGCCTATAATC	616
	40	ATGCCCTGTCCCTGCCAATACC	GAAGGCTGGGAGGAGGTTGTCG	396
MYBPC3	1	AATGTGGCCCTACCTTCTCC	TCCACACTTAGACCCAACC	260
	2	CGCTGTAGCCTCCACCTG	GTGAAAGCACCTCCTGTTCC	390
	3	CTGGGACGGGAGGAGAATGTG	GCTTTTGAGACCTGCCCTGGAC	385
	4	GGGTGACAGAGCAAGACTCC	ATTTGCCCTTGAACTCTTG	325
	5	GGTGAGTGTGAGCTGCTGTG	TTGTGCCCTTCTAGGGCTCTC	304
	6	TCCCAAAGTGGGATTACAG	CAGCACTCATGTCTGGATGG	355
	7	CATGAATGGGCAAGTCTGTG	GAAGGGCTCAGACTCCAG	212
	8	GGACCTCCTATCAGCCTTCC	GGGAGAAAGGGACACTAGCC	326
	9	CCTGCTCCTAATCCCTTTCC	AGGTGCAGTGTTGTGCTCAG	217
	10	AGAGCTGCAGGGCTACACAG	CACCTGCACTCCCTGTGTTG	378
	11	TGTGCCACCTACCTTTCTC	CCAGGACCAAGGAGCTGTAG	248
	12	GTGGCTACAGCTCCTTGCTC	GGCTAACCTATGCCCTCTCC	336
	13	GGCGGCACAGAGGGGATTG	ACCGGCAGGAGCAAAAGGATG	402
	14	CTCTCAGCCCCATCTCTG	GCTCCGTGCTACACTTCTCG	360
	15	TTTTGTCTCGGGCTCACTTC	GGTCCCACATCCTCAGGTG	333
	16	ACGGAGCTCTTTGTGAAAGG	TGATCAGGTGGTGTCTCTGC	378
	17	AGAAGAGGCCACAGCACTTG	CTCCCTCAGGGCTAGGTG	286
	18	GCAACATGGCACACACAG	CAGTCTCCACCTGTCCCATC	360
	19	ACAAGCCAGGACAAGTGAG	GCCTGGGTACGAAGTCAATC	345
	20	CCACAACTGACCATTTGACG	GCTCTTCCCTCTGTGAGTGG	328
	21	AGTGACCTGTGCTCCTCTG	TCCTAGCACTTGGCTGGTTC	267
	22	TCAGCTCCTCTGCTCCCTAC	TGTCCACATCCTTGTGATGG	329
	23	TGGGGTCTGACTTGGATCTC	TTGTGAGTGGCTGAATGAG	290
	24	CGGTTAGTTGGAGTGGGAAG	TGAATCAGGTGGAAGTTCAGC	371
	25	ACAGATCCGAGGGAAGGTG	CCAGTGCAGGATGAAAGGAG	386
	26	CTTGCTCAGACCCCTCTCTG	TGAATCTGCTCAATGGCAAG	242
	27	TCAGAGGAGTGGGCAGTGGGAGTG	CTGGGGTGTCAATGGCGGGTCTT	292
	28	GATCCCTGCCCTTTTGAAGTG	GCCCTGAGACATCAGTCCAC	390
	29	GGCCTGATCTGAGGTACCAG	CTGGAAAATGTGAGCTGTGG	388
	30	ACCCACAGCTCACATTTTCC	CACGGTGAGGACAGTGAAGG	365
	31	CCCTCTGCTGATCTGAATCC	AGGGCCACACAAGCTAGG	364
	32	TAGCTTTGTGTGGCCCTCTC	CCAAGGTGGAGAGAAAGCAG	291
	33	GCTTCCCTCCCTCTCTTACC	TCTGGAAGCTATTGCCCATC	368
	34	AGATGGGCAATAGCTTCCAG	CGGTTGTACCTGCAACACAG	235
ACTC1	2	CCTTCTGCTCTGTCTGTCC	TCCTAGATCGCTGGAAGTGAAG	300
	3	GGCAGTTAGATATAATGGACAAGA	AAGTCCGTGACTTGGGAAT	465
	4	TTGCCGTGGCTAGAGCAG	GGAAAGCAGACCCACACTG	274
	5	TCACTGAATCCGCCTACCTC	TTCTAGATTTTACTCTGGGAGACC	341
	6	TCTGTTCTCTCCCTCTACCTTG	CGTAGTTCTGCTTGAATACCAAGACT	341
	7	TCCTCCCAATGTGTTATTTGC	GGGAAGGTGGTTTGGAGAC	295
TNNT2	2	GCCAGAGCTCTTCTGAGGAA	GGTGCCCAAAACACACACA	247
	3-4	GTGTGTGCATGTGTGTGCAG	GGGACAGATGAGCTGCTTTTC	300
	5	TAGACGTCTTGACCCCATC	ACATGGGAAAGCCTGTTCTG	279
	6	TGGCTAGGGCTTATCTGTGG	CTTCCCTGGAAAGAGCACTG	227
	7	GGAATCCACAGGGATCTAGC	CGTGTCCACTGCACCATACT	219
	8	GGCAGTGCTGGAAGATTCTC	CAGGCCCTACTCAACCCACAG	201
	9	GCCAGGCCCTGCCAGAGGTCTT	CCCTGGGGGAGGCCCTGAAACAG	494

TPM1	10	ACGTCCGTGGAGCTGGTTGAAAGT	CCCGGCCAATATTGTCTCTTGACT	373
	11	TGGGAGCTACCCTCTCAGAA	CACAGCAGCTGGGAATCTCT	369
	12	GTAAACCCGGCTGACTACAG	AGCCAGCCCAATCTCTTCAC	258
	13	CAGGGGGTTTGGGAGGGTTAG	GTGGGGCACCTGCTCAGTTCTCT	402
	14	GGAGGGCCCTTTCTTACTGGAC	CCGGACCCAGTGAACCAGGAGGAG	207
	15	GCCCTCCTTGACCTTTAACTATCC	CGGAGGAGCCAGAGGAAGAAACCT	353
	16	GGGGGTGAAATGTGGGGCGGAGAA	GTGTGGGGGCAGGCAGGAGTGGTG	384
	1	CATATCTGGGAGAAGCAGGC	GGGTGAGGTTGGTGCTC	333
	2	TCCTGTCTTCTGGTCTG	CTCCAGCCCTGTGGTGAC	299
	3	GTCCCAGCCATTTCCTGAAG	CCTCCGGTTATTCCACCAG	267
4	GTGCATTTGGGAAGTTCAGC	ACTGTACATTGCTCCCTGAC	249	
5	CAAAACCCTTAGGGCCTGAT	GCCAGAAGGTCATGCTGTTT	249	
6	CATGCCCTTACCTGCACACTG	GAGGCATTGGAAGCTGAAAG	205	
7	AACATCTGTTGGCTGAGCTG	CCGGTTCATGAAAAACAAC	221	
8	GGTGATGTGCTTCATTTTCATC	GATGCCCTTGAATTGGAAAA	249	
9	CCTCACTACCCTCCATTTC	GATGGAGATTAGGAGACAAGG	243	
TNNI3	1-2	CCCTCACTGACCCTCCAAAC	TACCGCACCTCTGCTAGG	467
	3	GTACGGTAAGGGCTGGGTG	CAGGGTCTTGGATCCCTCC	200
	4	GGGCTCAAGTTGGACGTG	CCCACCCATTCTCAAGCTC	236
	5	CACGCCTGGTCTTTATCCTG	GGGATAGAGGCTGTACTGCTG	255
	6	TCCAGGTCTCCCTGTTTTTG	GTCAGGCAGAGACCAAGTCC	216
	7	GCCTAAGCCGGGAAGAGACTGGTA	GAGGACCCCTTACTAGTGCTTCT	437
	8	TGGGGAAATTTGGCAGGGATTATC	CCTCCTCAGGGCAGGGGCAGTAG	284
	1	AGCGGTCATGGGGTTATTTT	TGTAGTGGCTTCTCTCCTC	180
2	CTGAGCCCTGCAACAGAGAT	AAAGGTCCTCTCGGGGAATA	283	
3	GATCCCAAGATCCACTCCTG	TGGGAAATGACACCATCTTG	277	
4	CCACCCCATCTCTGATGATT	CAGCCAAAGTTGCTGTTTTCA	362	
5	TTATCTCTGGGGGAACCTTG	TTGGTGTCAAGTTGTGTGTG	248	
6	GGTGCTGAAGGCTGATTAGT	TTTAGACGAGAGGGGAGACG	250	
7	CAGCTATCCGTCCACTCAGG	GGTACTCGGGGAGAGAGAT	270	
MYL3	1	TCACCTACCCTGCTTCTGC	CTTGCTAGGTCCACTCTGGG	260
	2-3	GCTGAGACAGTTGACATTCTGG	CAATGCGAGATGTCAGGAAA	525
	4	GGTGGGGATAGCTCCTCATT	GGCAACAGAGTGGTTTCTCC	399
	5-6	GCCACCATCTAGAGGGATTCA	CAGCAGGATGTCAAGTGAGC	400
CSPR3	3	GGGGCCACTTCAATGTAGG	TTCAATGTGAATTTTGTGATGC	247
	4	TTGTATTCTTGGCTCAGGGG	GTCCATTCTCCCACTTCCAG	392
	5	TCTCAAGGCCACACAGCTC	CTCATTCTCCCAAATGGC	273
	6	TGGTCAGGGACTTGAAATGG	GGAAGACACGGGAAGACCTC	266
TCAP	7	GCTCAGACAGAAAGCCCTG	TCTGTGACGATTACTTGGC	217
	1	AATAGCCCTTGGAGGAAGGG	TGGCCTCATGGCTCAGTG	250
	2	CATGGGGAGAGCAAAGGG	CCCAACTCTGGGCAAACTAC	635
SGCD	1	AGCCAGCCATATCTCTTCATC	ATTCTTTCATCATCTTGCCC	365
	2	TTTTACAGCCTGAGGTGTTTTG	CAAGATCAATTCTCCAGATTTAG	242
	3	GCCCTTGGAGAGTTGTAATG	CTGTATTTCTGAGTGCCTCGC	226
	4	GATGAGACTAATGGTGTITCTCTC	TTGGGAGGACATATCCTGTTC	290
	5	GCTGATTGTGCCTACAGGTG	TGCACAGAGCAAGGCAATAG	194
	6	TGTCTTGTAGCATGAACCTTC	GGTTGGCCTGTTGAAGCTG	257
	7	TCAAAGAGAAGAGACGACAGCC	TGGCAGCCAGTGTCTAAAGC	299
PLN	2	CAAATGAGACGGTCTGGTG	TTGTTTTCTGTCTGCATGG	606
LDB3	1	GGAGTGCCTGAGTGCCC	ACACATGCCCTCCTCCAAG	230
	2	GTTGAATACTCCCGGTGAC	TTGCTATGGGACAATCCCTC	330
	3	CTCCTCACCAAGCCCTGC	CCAGCACTCCAGGAACCCAG	212
	4,1	GTGTGGCCTCTAACCGCTC	CTTTTGGGCCGAGTAGGTC	287
	4,2	CCCTCCGCCTTCTCCTC	GAGCACCGAGGACCCAG	305
	5	AGGGTGGGAACCTGGGCTC	GCTTCTGCAGTGCTGGG	170
	6	GCTTTCCTTGCTGTGTCTCC	ATGAGTGATGTGACCTGGG	173
	7	TCACAGGGTCTCTAGGCTCC	ACAGCTGGCCACAGGTAGAC	328
	8	CCTTGACTGCAGGCCCC	CTTCTTGGCTCTTGTGGCTC	282
	9,1	GCTAGGAGTGAGGGGAACGTG	GGGGCAAACTTCTGGGAG	347
	9,2	CCAACATAAACCTGCACCC	CTCAGACTGTGGGCAAGCAC	350
	10	GGGGTTCTTCAAATATCTAATTCC	CACGATCTTGGGGAAGGG	315
	11	CCTGGTGGGGTAGTCAAGC	TAGTTCCCTGTGCCTGCC	256
	12	GTTTGCTTGGCTTTGGGTC	ATCTGGCTCCCACTTCCTC	251
	13	ATTGAAATCTGCTCATGCC	GAATCCTTTGTTGCCAGCAG	215
TAZ1	1	CGAAGGGACCTCGGTCCAGT	CATGTACTCTGGCGGGGAAG	411
	2	ACCTAGCGGGCAGCCCGGA	TTTCCTCCCCCTGCCAGCA	210
	3	ATATGGGAAGTTGGGGCATG	AGAGCAGGAGGAGGGCAAAT	164
	4	GGCAGGACTAATTGCATCTG	CCCTCCAAAACAGAGACACT	196
	5	TTAAGCTGCTGGCCCAAGGT	CTTGAGTGATCCTCTCACCT	240
	6	TAAGCTAACCTGTCACCCCA	AGAGCACAGAGGCGAGGCTT	220
	7	AAGCCTCGCCTCTGTGCTCT	GGCCTAGTCTCAGCACCTGT	220
	8	GGGAGCTGAATTGAATGGA	CCTGGACCAAGAGGGATG	244
	9	ACAGAGAGATGGCATCTGGG	AGACAGCAGACAGGCAGACA	198
	10	ACTGCTCCTCATCACTCTTG	TCGGGAAGCTTGGCCAAGTG	246
	11	ACCTTGGCCAAGCTTCCCGA	AAGCATCAGTCCATCCCTCA	222
LMNA	1	TCCGAGCAGTCTCTGTCTT	CCCTCTCACTCCCTTCCTG	533
	2	CTGGCACTGTCTAGGCACAC	GGGAGGGCTAGGTAGAAGA	293
	3	TTGTGTTCTGTGACCCCTTTT	CACATAGGGCAAGGGAAGT	289
	4	CAGGAACTAATTCGATTTGGTTT	GTAAGGGTAGGGCTGCCAAG	277
	5	CTCCCAGTCAACCAAGTCCT	ACTCTAGGCCCTGGAGAGA	208
	6	GTCCCTCCTTCCCCATACTT	CCAAGTGGGGGTCTAGTCAA	360
	7	AGGTGCTGGCAGTGTCTCTCT	CTCTGAGGGCAAGGATGTT	395
	8	ATGGAAGGAGAGGGCCTCAAT	GAGGAGAAAAGGACACTTACC	300
	9	GACTCTGGGGAGGCCCTTG	ATCAGGGGGAGGCTCGTC	232
	10	GCCCTGACCCCTTGGACTT	CATTCTTTAAGTAAAAGATTTTTGG	237
	11	AGTGGTCAGTCCCAGACTCG	CCTACCCCTCGATGACCAG	384
	12	GGGAGATGCTACCTCCCTTTC	GTGAGGAGGACGAGGAA	173

## Anexo II

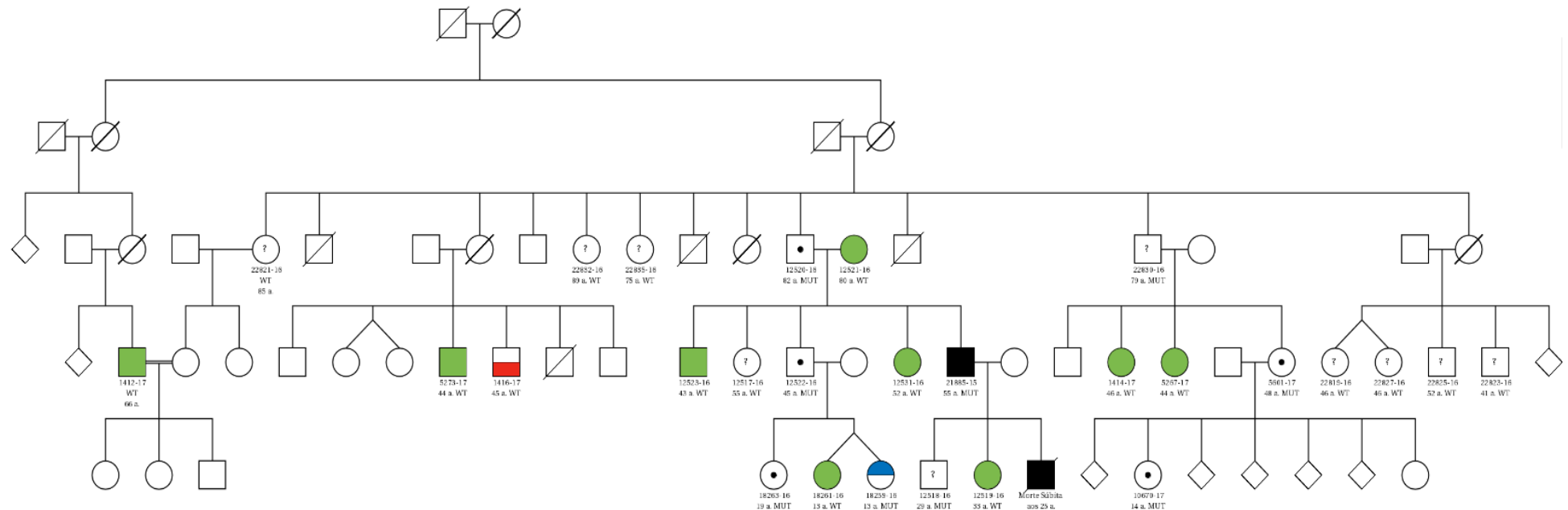


Figura 7 - Família estudada no Ipatimup Diagnósticos para a variante A797T no gene MYH7.

## Anexo III

Tabela 11 - Variantes no gene MYH7 detetadas no Ipatimup Diagnósticos entre 2011 e 2017 (classificação ACMG antes da revisão dos critérios)

GENE	NM (NCBI)	cDNA	PROTEÍNA	Nossa Classificação	ACMG Pop Data	ACMG Computacional predictive data	ACMG Functional Data	ACMG Segregation Data	ACMG De novo Data	ACMG Allelic Data	ACMG Other Database	ACMG Other Data
MYH7	NM_000257.3	c.11C>T	p.Ser4Leu	Significado incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.166G>A	p.Gly56Ser	Significado incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.452C>T	p.Pro151Leu	Significado incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.532G>A	p.Gly178Arg	Significado incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	PP5	0
MYH7	NM_000257.3	c.559A>G	p.Asn187Asp	Provavelmente patogénica	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.599C>T	p.Ala200Val	Significado incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.602T>C	p.Ile201Thr	Significado incerto	PS4	0	PP2	PP1	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.611G>A	p.Arg204His	Significado incerto	PM2	PP3;PM5	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.676G>A	p.Ala226Thr	Significado incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.715G>A	p.Asp239Asn	Provavelmente patogénica	PS4	0	PP2	PP1	0	0	0	PP4
MYH7	NM_000257.3	c.725C>T	p.Ser242Phe	Significado incerto	PM2	PP3;PM5	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.728G>A	p.Arg243His	Provavelmente patogénica	PS4	PP3;PM5	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.788T>C	p.Ile263Thr	Provavelmente patogénica	PS4	PP3	PP2	PP1	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.872C>T	p.Ser291Phe	Significado Incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.958G>A	p.Val320Met	Provavelmente patogénica	PS4	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1003G>C	p.Ala335Pro	Provavelmente patogénica	PS4	PP3	PP2	PP1	0	0	0	PP4
MYH7	NM_000257.3	c.1106G>A	p.Arg369Gln	Provavelmente patogénica	PS4	0	PP2	0	0	0	0	PP4
MYH7	NM_000257.3	c.1120G>A	p.Glu374Lys	Significado Incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1208G>A	p.Arg403Gln	Patogénica	PS4	PP3	PP2; PS3	0	0	0	PP5	PP4
MYH7	NM_000257.3	c.1324C>T	p.Arg442Cys	Provavelmente patogénica	PS4	PP3	PP2	0	0	0	0	0

MYH7	NM_000257.3	c.1357C>T	p.Arg453Cys	Patogénica	PS4	PP3	PP2	PP1	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1358G>A	p.Arg453His	Provavelmente patogénica	PS4	PP3	PM1; PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1432A>G	p.Ile478Val	Significado incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1681G>A	p.Ala561Thr	Significado incerto	PM2	BP4	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1750G>A	p.Gly584Ser	Patogénica	PS4	PM5	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1750G>C	p.Gly584Arg	Patogénica	PS4	PP3	PS3	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2011C>T	p.Arg671Cys	Significado incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2012G>A	p.Arg671His	Significado incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2101G>A	p.Gly701Ser	Significado incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2128C>T	p.Pro710Ser	Significado incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2134C>T	p.Arg712Cys	Significado incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2146G>A	p.Gly716Arg	Provavelmente patogénica	PS4	PP3	PP2	PP1	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2156G>A	p.Arg719Gln	Patogénica	PS4	PS1	PM1	PP1	0	0	PP5	0
MYH7	NM_000257.3	c.2183C>T	p.Ala728Val	Significado Incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	BP5	0
MYH7	NM_000257.3	c.2221G>C	p.Gly741Arg	Provavelmente patogénica	PS4	PM5; PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2348G>T	p.Arg783Leu	Provavelmente patogénica	PM2	BP4;PS1	PP2	PP1	0	0	0	PP4
MYH7	NM_000257.3	c.2389G>A	p.Ala797Thr	Provavelmente patogénica	PS4	BP4	PP2	PP1	0	0	0	PP4
MYH7	NM_000257.3	c.2663A>C	p.Gln888Pro	Significado Incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2770G>A	p.Glu924Lys	Provavelmente patogénica	PS4	PM5; PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2821C>T	p.Arg941Cys	Significado Incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	BP5	0
MYH7	NM_000257.3	c.3056C>A	p.Thr1019Asn	Significado Incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.3152C>T	p.Ala1051Val	Significado Incerto	0	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.3358G>A	p.Glu1120Lys	Significado Incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.3622G>A	p.Asp1208Asn	Significado Incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.3942C>G	p.Asp1314Glu	Significado Incerto	0	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4066G>A	p.Glu1356Lys	Patogénica	PS4; PM2	PP3	PS3; PP2	PP1	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4377G>T	p.Lys1459Asn	Significado Incerto	PS4	PP3	PP2	0	0	0	0	0

MYH7	NM_000257.3	c.4423C>T	p.Arg1475Cys	Significado Incerto	0	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4558G>A	p.Gly1520Arg	Significado Incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4721G>A	p.Arg1574Gln	Significado Incerto	0	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4817G>A	p.Arg1606His	Significado Incerto	PS4	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4992C>A	p.Asn1664Lys	Significado Incerto	0	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.5066G>A	p.Arg1689His	Significado Incerto	0	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.5134C>T	p.Arg1712Trp	Significado Incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.5342G>A	p.Arg1781His	Provavelmente patogénica	PS4	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.5623G>T	p.Val1875Phe	Significado Incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2539_2541delAAG	p.Lys847del	Provavelmente patogénica	PS4	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1400T>C	p.Ile467Thr	Provavelmente patogénica	PM2	PP3	PP2	PP1	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.189C>T	p.Thr63=	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.732C>T	p.Phe244=	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1062C>T	p.Gly354=	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1095G>A	p.Lys365=	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1128C>T	p.Asp376=	Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2967T>C	p.Ile989=	Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.5106G>A	p.Ala1702=	Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4644+10_4644+13dup		Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2206A>C	p.Ile736Leu	Significado incerto	PS4	PS1	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4499G>A	p.Arg1500Gln	Provavelmente patogénica	PS4	PS1	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.261C>T	p.Ile87=	Provavelmente benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.975C>T	p.Asp325=	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.3153G>A	p.Ala1051=	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4472C>G	p.Ser1491Cys	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.3337-3dupC		Provavelmente benigna	BS1	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.597A>G	p.Ala199=	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0

MYH7	NM_000257.3	c.3351G>A	p.Glu1117=	Benigna	BS1	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4566T>C	p.Thr1522=	Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2734A>G	p.Lys912Glu	Significado Incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.5561C>T	p.Thr1854Met	Significado Incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1755C>A	p.Ile585=	Significado Incerto	0	PP3	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.5071G>A	p.Val1691Met	Significado Incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1002C>T	p.Asn334=	Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1767C>T	p.Asn589=	Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.3645G>C	p.Gln1215His	Provavelmente patogénica	PS4	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.5537G>A	p.Arg1846His	Significado Incerto	PM2	PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.297C>T	p.Pro99=	Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2467G>A	p.Gly823Arg	Significado Incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2598C>T	p.Ser866Ser	Significado Incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4806C>T	p.Asp1602=	Provavelmente benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1324C>T	p.Arg442Cys	Provavelmente patogénica	PS4	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4009C>T	p.Arg1337Trp	Significado Incerto	0	0	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2715T>G	p.Cys905Trp	Provavelmente patogénica	PM2	PS1; PP3	PP2	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2711G>A	p.Arg904His	Provavelmente patogénica	PM2	PS1; PP3	PP2	0	0	0	0	PP4
MYH7	NM_000257.3	c.957C>T	p.Thr319=	Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2142C>G	p.Leu714=	Provavelmente benigna	PM2	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4948T>C	p.Leu1650=	Provavelmente benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4083T>G	p.Leu1361=	Provavelmente benigna	0	BP7	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.2859C>T	p.Asp953=	Provavelmente benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4965T>C	p.Ile1655=	Provavelmente benigna	0	BP7	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4980A>C	p.Ala1660=	Provavelmente benigna	0	BP7	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.4908C>T	p.Ala1636=	Provavelmente benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.999T>G	p.Asp333Glu	Significado Incerto	PM2	0	PP2	0	0	0	0	0

MYH7	NM_000257.3	c.3853+7C>T		Provavelmente benigna	<b>BS1</b>	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1395C>T	p.Phe465=	Provavelmente benigna	<b>BS1</b>	0	0	0	0	0	0	0
MYH7	NM_000257.3	c.1188C>A	p.Leu396=	Provavelmente benigna	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 12 - Variantes no gene MYBPC3 detetadas no Ipatimup Diagnósticos entre 2011 e 2017 (classificação ACMG antes da revisão dos critérios)

GENE	NM (NCBI)	cDNA	PROTEÍNA	Nossa Classificação	ACMG Pop Data	ACMG Computacional predictive data	ACMG Functional Data	ACMG Segregation Data	ACMG De novo Data	ACMG Allelic Data	ACMG Other Database	ACMG Other Data
MYBPC3	NM_00256.3	c.13G>C	p.Gly5Arg	Provavelmente Benigna	<b>PS4</b>	0	<b>BS3</b>	0	0	0	0	<b>BP5</b>
MYBPC3	NM_00256.3	c.50G>A	p.Arg17Gln	Significado incerto	<b>PS4</b>	0	0	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.131G>A	p.Arg44His	Significado Incerto	<b>PS4</b>	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.223G>A	p.Asp75Asn	Significado Incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.292G>A	p.Glu98Lys	Significado Incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.362del	p.Pro121Argfs*38	Patogénica	<b>PS4; PM2</b>	<b>PVS1</b>	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.446C>A	p.Ala149Asp	Significado Incerto	0	<b>BP4</b>	0	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.458C>A	p.Pro153His	Significado incerto	<b>PM2</b>	0	0	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.502G>A	p.Val168Met	Significado incerto	<b>PS4</b>	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.506-12delC		Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.530G>A	p.Arg177His	Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	<b>BP6</b>	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.565G>A	p.Val189Ile	Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.706A>G	p.Ser236Gly	Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.716G>A	p.Cys239Tyr	Significado incerto	<b>PM2</b>	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	0
MYBPC3	NM_00256.3	c.772G>A	p.Glu258Lys	Provavelmente Patogénica	<b>PS4</b>	0	<b>PS3</b>	0	0	0	0	0



MYB PC3	NM_00 0256.3	c.786C>T	p.Thr262Thr	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.814C>T	p.Arg272Cys	Significado incerto	PS4	PP3	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.817C>T	p.Arg273Cys	Significado incerto	PM2	PP3	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.833G>A	p.Gly278Glu	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.836G>C	p.Gly279Ala	Significado incerto	PM2	BP4	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.905G>A	p.Arg302Lys	Significado incerto	PM2	PP3	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.977G>A	p.Arg326Gln	Benigna	BA1?	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1003C>T	p.Arg335Cys	Significado incerto	0	PP3	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1223G>A	p.Ser408Asn	Significado incerto	PM2	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1300_1301del	p.Tyr434Profs*10	Provavelmente patogénica	PM2	PVS1	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1484G>A	p.Arg495Gln	Provavelmente Patogénica	PS4	PM5	0	PP1	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1504C>T	p.Arg502Trp	Provavelmente patogénica	PS4	PP3	PS3	PP1	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1505G>A	p.Arg502Gln	Provavelmente Patogénica	PM2	PP3	PM1	PP1	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1624G>C	p.Glu542Gln	Provavelmente patogénica	PM2	PP3	0	BS4	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1658A>G	p.Asp553Gly	Significado incerto	PM2	PP3	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1684G>A	p.Ala562Thr	Significado incerto	PS4	PP3	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1831G>A	p.Glu611Lys	Significado incerto	0	PP3	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1855G>A	p.Glu619Lys	Significado incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2177G>A	p.Arg726His	Significado incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2198G>A	p.Arg733His	Significado incerto	PM2	0	0	?	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2311G>A	p.Val771Met	Significado incerto	0	PP3	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2618C>T	p.Pro873Leu	Significado incerto	PS4	PP3	0	0	0	0	0	0

MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2670G>A	p.Trp890*	Patogénica	<b>PS4; PM2</b>	<b>PVS1</b>	0	<b>PP1</b>	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2686G>A	p.Val896Met	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2728C>A	p.Pro910Thr	Significado incerto	0	<b>BP4</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2762A>T	p.Glu921Leu	Significado incerto	<b>PM2</b>	<b>BP4</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2765G>A	p.Gly922Glu	Significado incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2827C>T	p.Arg943*	Patogénica	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2870G>A	p.Thr957Ser	Significado incerto	0	<b>BP4</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2873C>T	p.Thr958Ile	Significado incerto	<b>PM2</b>	<b>BP4</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3065G>C	p.Arg1022Pro	Provavelmente patogénica	<b>PS4</b>	<b>PP3; PM5</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3107G>A	p.Arg1036His	Significado incerto	0	<b>BP4</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3170C>T	p.Thr1057Met	Provavelmente Benigna	0	<b>BP4</b>	0	0	0	0	0	<b>BP5</b>
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3241A>C	p.Asn1081His	Significado incerto	<b>PM2</b>	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	<b>BP5</b>
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3463A>T	p.Lys1155*	Provavelmente patogénica	<b>PM2</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3535G>A	p.Glu1179Lys	Significado incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3614G>A	p.Arg1205Gln	Significado incerto	<b>PM2</b>	<b>PP3</b>	<b>PP2</b>	0	0	0	0	<b>PP4</b>
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3617G>A	p.Gly1206Asp	Provavelmente patogénica	<b>PM2</b>	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3676C>T	p.Arg1226Cys	Significado incerto	<b>PM2</b>	<b>PP3</b>	0	<b>PP1</b>	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3811C>T	p.Arg1271*	Provavelmente patogénica	<b>PM2</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1226+6T>C		Significado incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1513_1515del	p.Lys505del	Provavelmente patogénica	<b>PS4</b>	<b>PP3</b>	0	<b>PP1</b>	0	0	0	<b>PP4</b>
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1800delA	p.Lys600Asnfs*2	Patogénica	<b>PS4</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2052delG	p.Gln684fs*69	Provavelmente Patogénica	<b>PM2</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0

MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2081delC	p.Pro694Gln fs*59	Provavelmente Patogénica	<b>PM2</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2151-1G>A		Provavelmente Patogénica	<b>PM2</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2440_2442delAAG	p.Lys814del	Significado incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2441_2443delAGA	p.Lys814del	Significado incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2864_2865delCT	p.Pro955Arg fs*95	Patogénica	<b>PS4</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3036_3037ins5	p.Pro1012Gln fs*1021	Provavelmente Patogénica	<b>PM2</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3068_3069insA ou c.3068dup	p.Asn1023Lys fs*28	Provavelmente Patogénica	<b>PM2</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3191-4C>A		Significado incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.407-1G>A		Significado incerto	0	<b>PP3</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2860G>A	c.Ala954Thr	Significado incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.472G>A	p.Val158Met	Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3392T>C	p.Ile1131Thr	Significado incerto	0	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1321G>A	p.Glu441Lys	Significado incerto	<b>PM2</b>	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1828G>A	p.Asp610Asn	Significado incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1298C>G	p.Ala433Gly	Provavelmente patogénica	<b>PS4</b>	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	<b>PP4</b>
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.492C>T	p.Gly164=	Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3288G>A	p.Glu1096=	Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2286C>G	p.Val762=	Provavelmente Benigna	<b>PM2</b>	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.537C>T	p.Ala179=	Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.471C>T	p.Phe157=	Provavelmente benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1869C>T	p.Cys623=	Provavelmente benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2498C>T	p.Ala833Val	Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0

MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2547C>T	p.Val849=	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3742G>A	p.Gly1248Arg	Significado Incerto	0	PP3	0	BS4	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1790+7G>A		Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3702_3705delAGTG	p.Val1235*	Provavelmente patogénica	PM2	PVS1	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.183_194delinsAAGT GCTGGGAAGT	p.Thr62Serfs*6	Provavelmente patogénica	PM2	PVS1	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2602G>A	p.Gly868Ser	Significado Incerto	PS4	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3763G>A	p.Ala1255Thr	Significado incerto	0	PP3	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.649A>G	p.Ser217Gly	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1564G>A	p.Ala522Thr	Benigna	BS1	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.646G>A	p.Ala216Thr	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.2961C>T	p.Val987=	Provavelmente benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1223+2T>G		Provavelmente patogénica	PM2	PVS1	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1363C>T	p.Leu455Phe	Significado incerto	0	PP3	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3408C>G	p.Tyr1136*	Patogénica	PS4	PVS1; PS1	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.3591_3592insACAC T	p.Ala1198Thrs*41	Provavelmente patogénica	PM2	PVS1	0	0	0	0	0	0
MYB PC3	NM_00 0256.3	c.1158A>T	p.Glu386Asp	Significado incerto	PM2	PP3	0	0	0	0	0	0

Tabela 13 - Variantes no gene *TNNT2* detetadas no Ipatimup Diagnósticos entre 2011 e 2017 (classificação ACMG antes da revisão dos critérios)

GENE	NM (NCBI)	cDNA	PROTEÍNA	Nossa Classificação	ACMG Pop Data	ACMG Computacional predictive data	ACMG Functional Data	ACMG Segregation Data	ACMG De novo Data	ACMG Allelic Data	ACMG Other Database	ACMG Other Data
<i>TNNT2</i>	NM_001001430.2	c.275G>A	p.Arg92Gln	Provavelmente Patogénica	PS4	PP3	PM1	0	0	0	PP5	0

TNNT2	NM_001001430.2	c.318C>T	p.Ile106=	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.325C>T	p.His109Tyr	Provavelmente Patogénica	PS4	PP3	0	PP1	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.389G>A	p.Arg130His	Sgnificado Incerto	PM2	PM5	0	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.415C>T	p.Arg139Cys	Sgnificado Incerto	PM2	PM5	0	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.476G>C	p.Arg159Pro	Sgnificado Incerto	PM2	PM5	0	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.586C>T	p.Arg196Trp	Provavelmente Patogénica	PS4	PP3	0	PP1	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.640G>A	p.Glu214Lys	Significado incerto	PM2	PP3	0	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.662T>C	p.Ile221Thr	Patogénica	PS4	PP3	PP2	0	0	0	0	PP4
TNNT2	NM_001001430.2	c.758A>G	p.Lys253Arg	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.808G>C	p.Asp270His	Sgnificado Incerto	PM2	PM5	0	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.812A>T	p.Asn271Ile	Provavelmente patogénica	PS4	0	0	PP1	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.824C>T	p.Ser275Phe	Sgnificado Incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.832C>T	p.Arg278Cys	Sgnificado Incerto	0	PP3	PP1	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.860G>A	p.Trp287*	Patogénica	PS4	PVS1	0	PP1	0	0	0	PP4
TNNT2	NM_001001430.2	c.487_489delGAG	p.Glu163del	Patogénica	PS4	0	PS3	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.690-6G>A		Sgnificado Incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.207G>A	p.Ser69Ser	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.480C>T	p.Ile160=	Benigna	BA1	0	0	0	0	0	0	0
TNNT2	NM_001001430.2	c.517C>T	p.Arg173Trp	Patogénica	PS4	PP3	PS3	PP1	0	0	0	0

<i>TNNT2</i>	NM_001001430.2	c.721T>C	p.Tyr241His	Sgnificado Incerto	<b>PM2</b>	<b>BP4</b>	0	0	0	0	0	0
<i>TNNT2</i>	NM_001001430.2	c.629_631del	p.Lys210del	Patogénica	<b>PS4</b>	0	<b>PS3</b>	<b>PM</b>	0	0	0	0
<i>TNNT2</i>	NM_001001430.2	c.83C>T	p.Ala28Val	Sgnificado Incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>TNNT2</i>	NM_001001430.2	c.115G>A	p.Glu39Lys	Sgnificado Incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>TNNT2</i>	NM_001001430.2	c.274C>T	p.Arg92Trp	Provavelmente Patogénica	<b>PS4</b>	<b>PP3; PM5</b>	<b>PS3</b>	0	0	0	0	0
<i>TNNT2</i>	NM_001001430.2	c.53-11_53-7delCTTCT		Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0
<i>TNNT2</i>	NM_001001430.2	c.853G>A	p.Gly285Arg	Sgnificado Incerto	0	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	0
<i>TNNT2</i>	NM_001001430.2	c.240C>G	p.Pro80=	Provavelmente Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>TNNT2</i>	NM_001001430.2	c.547C>A	p.His183Asn	Sgnificado Incerto	<b>PM2</b>	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 14 - Variantes no gene *LMNA* detetadas no Ipatimup Diagnósticos entre 2011 e 2017 (classificação ACMG antes da revisão dos critérios)

GENE	NM (NCBI)	cDNA	PROTEÍNA	Nossa Classificação	ACMG Pop Data	ACMG Computacional predictive data	ACMG Functional Data	ACMG Segregation Data	ACMG De novo Data	ACMG Allelic Data	ACMG Other Database	ACMG Other Data
<i>LMNA</i>	NM_170707.3	c.568C>T	p.Arg190Trp	Patogénica	<b>PS4</b>	<b>PP3</b>	0	<b>PP1</b>	0	0	0	0
<i>LMNA</i>	NM_170707.3	c.1634G>A	p.Arg545His	Significado Incerto	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>LMNA</i>	NM_170707.3	c.1698C>T	p.His566=	Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0
<i>LMNA</i>	NM_170707.3	c.780G>C	p.Lys260Asn	Provavelmente patogénica	<b>PS4</b>	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	0
<i>LMNA</i>	NM_170707.3	c.51C>T	p.Ser17=	Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0
<i>LMNA</i>	NM_170707.3	c.861T>C	p.Ala287=	Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0
<i>LMNA</i>	NM_170707.3	c.1338T>C	p.Asp446=	Benigna	<b>BA1</b>	0	0	0	0	0	0	0
<i>LMNA</i>	NM_170707.3	c.1249_1260delinsCC	p.Lys417Profs*60	Provavelmente patogénica	<b>PM2</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0
<i>LMNA</i>	NM_170707.3	c.612G>A	p.Leu204=	Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>LMNA</i>	NM_170707.3	c.816A>G	p.Asp272Gly	Significado Incerto	0	0	0	0	0	0	0	0

LMNA	NM_170707.3	c.1551G>A	p.(=)	Provavelmente Benigna	0	0	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.1825G>A	p.Gly609Arg	Significado Incerto	<b>PM2</b>	0	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.826C>T	p.Gln276*	Provavelmente Patogénica	<b>PM2</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.1930C>T	p.Arg644Cys	Significado Incerto	<b>BS1</b>	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.370G>A	p.Glu124Lys	Significado Incerto	<b>PM2</b>	<b>PP3</b>	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.1039G>A	p.Glu347Lys	Significado Incerto	0	0	<b>PS3</b>	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.1699-7T>C		Significado Incerto	<b>PM2</b>	0	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.1003C>T	p.Arg335Trp	Patogénica	<b>PM2; PS4</b>	<b>PP3</b>	0	<b>PP1</b>	<b>PS2</b>	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.1318G>A	p.Val440Met	Significado Incerto	<b>PM2</b>	0	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.1604G>C	p.Gly535Ala	Significado Incerto	<b>PM2</b>	0	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.1982G>C	p.Cys661Ser	Significado Incerto	<b>PM2</b>	0	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.460G>A	p.Glu154Lys	Significado Incerto	<b>PM2</b>	0	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.1142del	p.Glu381Glyfs*99	Provavelmente Patogénica	<b>PM2</b>	<b>PVS1</b>	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.357C>T	p.Arg119=	Provavelmente Benigna	<b>BS1</b>	0	0	0	0	0	0	0
LMNA	NM_170707.3	c.892C>T	p.Arg298Cys	Provavelmente Patogénica	<b>PS4</b>	<b>PP3</b>	<b>PS3</b>	0	0	0	0	0

## Anexo IV



Figura 8 - Esquema representativo da distribuição de variantes patogênicas e benignas ao longo da estrutura de cada proteína. (A) - MYH7 – seta e caixa indicam o cluster de variantes patogênicas neste gene; (B) MYBPC3; (C) LMNA (adaptado de UniProt)



